



FACULDADE DE DESPORTO
UNIVERSIDADE DO PORTO

EFEITO DA ADIÇÃO DE PROTEÍNA A UMA BEBIDA COM HIDRATOS DE CARBONO INGERIDA ANTES DO EXERCÍCIO EM PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS – Um estudo randomizado duplo-cego em atletas de meio-fundo

Dissertação apresentada com vista à obtenção do grau de Mestre em Ciências do Desporto, área de especialização em Treino de Alto Rendimento, nos termos do Decreto-Lei nº74/2006 de 24 de Março.

Orientadores:

Prof. Doutor António Alexandre Ascensão

Prof. Doutor Vitor Hugo Teixeira

Ana Margarida da Silva Cardoso Lopes

Porto, 2018

Mestrado:

Lopes, A. M. S. C. (2018). **EFEITO DA ADIÇÃO DE PROTEÍNA A UMA BEBIDA COM HIDRATOS DE CARBONO INGERIDA ANTES DO EXERCÍCIO EM PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS** – Um estudo randomizado duplo-cego em atletas de meio-fundo. Porto: A. Lopes. Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Treino de Alto Rendimento, apresentada à Faculdade de Desporto da Universidade do Porto.

Palavras-chave: PROTEÍNA, HIDRATOS DE CARBONO, CORRIDA, PERFORMANCE.

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Foi um percurso longo e árduo, repleto de novas experiências e aprendizagens. A sua concretização só foi possível pelo apoio, colaboração e dedicação de várias pessoas a quem estou extremamente agradecida:

ao Prof. Doutor Vitor Hugo Teixeira por continuar a confiar em mim, pela disponibilidade, pela orientação e revisão do trabalho.

ao Prof. Doutor António Ascensão por me aceitar desde logo como sua orientanda, pelo apoio incondicional, pela orientação e revisão do trabalho.

ao Prof. Doutor Ricardo Fernandes pela colaboração e partilha de conhecimentos.

ao Prof. Doutor José Magalhães pelo seu contributo.

ao Prof. Doutor João Tiago Magalhães e à Dra Sandra Martins pela disponibilidade e colaboração.

ao David Rizo-Roca pela ajuda preciosa na recolha das amostras e tratamento dos dados estatísticos, por se mostrar sempre disponível.

ao Jorge Beleza pelo apoio e colaboração.

ao Centro de Investigação em Atividade Física, Saúde e Lazer (CIAFEL), ao laboratório de fisiologia da FADEUP, ao serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar São João e à FCNAUP por possibilitarem a realização deste trabalho de investigação.

ao Tiago Montanha, Manoel Rios, Diogo Carvalho e Sofia Monteiro o meu muito obrigada, pela ajuda na recolha dos dados que seria impossível sem o vosso empenho.

à Sílvia Costa, minha enfermeira preferida, que sorte ter-te por perto. Obrigada por toda a dedicação, por todas as horas incansáveis!

aos atletas participantes no estudo por demonstrarem camaradagem, rigor e compromisso.

ao Prof. Doutor Filipe Conceição pelo incentivo e palavras sábias, que muito contribuíram para ter mais serenidade.

às minha amigas, Ana Cunha, Catarina Barriga Negra, Sílvia Araújo, Sofia Fernandes e Lusmar Rodriguez, pelas palavras de conforto e incentivo.

aos meus padrinhos, tios e primos pela compreensão e carinho.

aos meus pais pelo apoio constante, pelo conforto e por me ajudarem a lutar pelos meus sonhos. Ao meu irmão por estar sempre lá.

ao Tony pela paciência, pela capacidade extraordinária em me fazer voltar à calma e por compreender todas as horas de ausência. Obrigada meu amor por tornares o meu mundo melhor!

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos	V
Índice de tabelas	IX
Índices de figuras	XI
Resumo	XIII
Abstract	XV
Lista de abreviaturas	XVII
1. Introdução	1
2. Revisão da literatura	5
2.1. Sistemas de produção de energia e <i>performance</i>	5
2.2. Indicadores fisiológicos associados à <i>performance</i> de <i>endurance</i>	7
2.3. Nutrição e <i>performance</i>	9
3. Objetivos	19
3.1. Objetivos gerais	19
3.1.1. Objetivos específicos	19
4. Material e métodos	21
4.1. Caracterização da amostra	21
4.2. Protocolo experimental	21
4.3. Avaliação antropométrica	22
4.4. Nutrição e atividade física	23
4.5. Protocolo de suplementação	23
4.6. Protocolo de exercício	25
4.7. Indicadores decorrentes da análise das trocas gasosas e frequência cardíaca	25
4.8. Consumo máximo de oxigénio	25
4.9. Limiar anaeróbio	26
4.10. Lactato sanguíneo, glicose, insulina, glicagina e ácidos gordos livres	26
4.11. Desconforto gastrointestinal e percepção subjetiva de esforço	27
4.12. Análise estatística	27
5. Resultados	29

5.1.	Avaliação antropométrica - - - - -	29
5.2.	Volume e intensidade de corrida - - - - -	29
5.3.	Ingestão energética e macronutrientes - - - - -	30
5.4.	Peso pré- e pós-exercício e percentagem de variação do peso - - -	32
5.5.	Concentração de lactato - - - - -	32
5.6.	Limiar anaeróbio - - - - -	34
5.7.	Consumo máximo de oxigénio - - - - -	34
5.8.	Perceção subjetiva de esforço, frequência cardíaca e desconforto gastrointestinal - - - - -	35
5.9.	Tempo até à exaustão - - - - -	37
5.10.	Quociente respiratório - - - - -	38
5.11.	Glicose, insulina, ácidos gordos livres e glicagina - - - - -	40
6.	Discussão e conclusão - - - - -	45
7.	Sugestões para investigações futuras - - - - -	53
8.	Bibliografia - - - - -	55

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Composição e ingredientes de cada suplemento - - - - -	24
Tabela 2. Características físicas dos participantes em estudo - - - - -	29
Tabela 3. Volume e intensidade de corrida realizado nos dois dias anteriores a cada teste - - - - -	30
Tabela 4. Ingestão energética e macronutrientes - - - - -	31
Tabela 5. Peso (kg) pré- e pós-exercício e perda de peso (%) respectiva - - -	32
Tabela 6. Concentração de lactato - - - - -	33
Tabela 7. Limiar anaeróbio e velocidade correspondente - - - - -	34
Tabela 8. Consumo máximo de oxigênio - - - - -	35
Tabela 9. Percepção subjetiva de esforço, Frequência cardíaca e Desconforto gastrointestinal - - - - -	36
Tabela 10. Tempo de corrida nos patamares 8 e 9 e tempo total do teste experimental - - - - -	37
Tabela 11. Quociente respiratório - - - - -	39
Tabela 12. Concentração de glicose - - - - -	40
Tabela 13. Concentração de insulina - - - - -	41
Tabela 14. Concentração de ácidos gordos livres - - - - -	42
Tabela 15. Concentração de glicagina - - - - -	44
Tabela 16. Comportamento da glicagina ao longo do exercício - - - - -	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Protocolo experimental - - - - -	22
Figura 2. Escalas para avaliação da Percepção subjetiva de esforço (esquerda) e Desconforto gastrointestinal (direita) - - - - -	27
Figura 3. Duração do teste experimental - - - - -	38
Figura 4. Quociente respiratório - - - - -	38
Figura 5. Concentração de glicose - - - - -	40
Figura 6. Concentração de insulina - - - - -	41
Figura 7. Concentração de ácidos gordos livres - - - - -	42
Figura 8. Concentração de glicagina - - - - -	43
Figura 9. Incremento percentual de glicagina - - - - -	44

RESUMO

O presente estudo pretendeu analisar se a ingestão pré-exercício de HC+PRO (0,75+0,25g/kg) vs. HC apenas (1,0g/kg) influencia de forma distinta parâmetros fisiológicos, biomarcadores sanguíneos de metabolismo e a *performance* num exercício incremental composto por várias intensidades de corrida até à exaustão em atletas de atletismo da disciplina de meio-fundo. Dez atletas (7 masculinos e 3 femininos – idade $24,7 \pm 5,7$ e $24,3 \pm 1,5$ anos; peso $63,6 \pm 6,8$ e $54,4 \pm 3,1$ kg, respetivamente) foram testados em três ocasiões, com 2-3 dias de intervalo, de forma randomizada e duplamente-cega e com inclusão de placebo. Os participantes chegaram ao laboratório de manhã com pelo menos 10 horas de jejum e, após 15 minutos de repouso, ingeriram uma bebida (HC+PRO, HC ou PLA) 30 minutos antes de iniciarem o exercício-teste. Este consistiu na realização de pelo menos sete patamares de corrida com duração de 4 minutos cada e intervalo de 1 minuto entre eles, com incrementos de 1 km/h de forma sucessiva, sendo que os patamares subsequentes poderiam ser completados até ao fim ou finalizarem com a exaustão. Foram colhidas amostras de sangue venoso em quatro momentos (jejum, 30 minutos após a ingestão da bebida, no final dos patamares 3 e 7) e sangue capilar em repouso e no final de cada patamar. O DGI e a PSE foram registados no final de cada patamar. A adição de PRO não teve influência nos parâmetros fisiológicos ($VO_{2\text{máx}}$, LAn, QR, FC), na $[La^-]$, no DGI e na PSE. Verificou-se que o tempo até à exaustão foi superior na condição de $PLA > HC > HC+PRO$ embora sem significado estatístico (1895, 1865 e 1860 segundos, respetivamente). Os biomarcadores sanguíneos analisados (glicose, insulina, AGLs e glicagina) não se apresentaram diferentes entre as condições. Com a ingestão de PRO verificou-se uma diminuição não significativa da glicemia e aumento da insulina comparativamente com a ingestão de HC apenas. Em suma, a adição de PRO a uma menor quantidade de HC, ingerida 30 minutos antes do referido exercício, não se traduziu em alterações na *performance*, assim como em indicadores fisiológicos e bioquímicos associados ao metabolismo, quando comparada com a ingestão de HC apenas.

PALAVRAS-CHAVE: PROTEÍNA, HIDRATOS DE CARBONO, CORRIDA, PERFORMANCE.

ABSTRACT

The present study aimed to analyze whether the pre-exercise intake of CHO+PRO (0.75+0.25g/kg BW) vs. CHO alone (1.0g/kg BW) distinctly influences physiological parameters, blood metabolic biomarkers and performance during a stepwise running exercise comprising different intensities until exhaustion in middle distance runners. Ten athletes (7 males and 3 females – age 24.7 ± 5.7 e 24.3 ± 1.5 years; BW 63.6 ± 6.8 e 54.4 ± 3.1 kg, respectively) were tested in three occasions with 2-3 days of interval, in a randomized and double-blind design and with the inclusion of placebo. Participants arrived at the laboratory in the morning with at least 10 hours of fasting and, after resting for 15 minutes, they ingested the beverage (CHO+PRO; CHO or PLA) 30 minutes before starting the trial. This consisted in at least seven 4 min running stages with 1 min rest between each exercise period, with the increase of 1 km/h. The subsequent stage could be completed until the end or finished with exhaustion. Venous blood samples were collected in four moments (fasting, 30 minutes after the ingestion of the beverage and after the 4th and 7th stages) and capillary blood at rest and at the end of each stage. The GID and the RPE were registered after each stage. The addition of PRO had no influence in the analyzed physiological parameters (VO_{2max} , LAn, RER, HR), [La-], GID and RPE. Time until exhaustion was higher in PLA>CHO>CHO+PRO although not significant (1895, 1865 and 1860 seconds, respectively). The analyzed blood metabolic biomarkers (glucose, insulin, FFAs and glycine) were not different between the studied conditions. With the ingestion of PRO, non-significant decrease of glycemias and increase of insulinemia were observed when compared with ingestion of CHO only. In conclusion, the addition of PRO to a smaller amount of CHO, ingested 30 minutes before the described exercise, had no impact on the performance, physiological and biochemical indicators associated to metabolism when compared to the ingestion of CHO only.

KEYWORDS: PROTEIN, CARBOHYDRATE, RUNNING, PERFORMANCE.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGLs	Ácidos gordos livres
ATP	Trifosfato de adenosina
CO ₂	Dióxido de carbono
DGI	Desconforto gastrointestinal
D.p.	Desvio padrão
FC	Frequência cardíaca
HC	Hidratos de carbono
HC+PRO	Hidratos de carbono e proteína
IG	Índice glicémico
IMC	Índice de massa corporal
La ⁻	Lactato
LAn	Limiar anaeróbio
M	Média
O ₂	Oxigénio
PCr	Fosfocreatina
PLA	Placebo
PRO	Proteína
PSE	Perceção subjetiva de esforço
QR	Quociente respiratório
SPM	Síntese proteica muscular
VO _{2máx}	Consumo máximo de oxigénio
vVO _{2máx}	Velocidade ao consumo máximo de oxigénio
[La ⁻]	Concentração de lactato

1. INTRODUÇÃO

O desempenho desportivo resulta da interação entre fatores físicos, fisiológicos, bioquímicos, psicológicos, entre muitos outros (Amy L. Heck et al., 2004). A nutrição, juntamente com a variação genética, desempenham um papel fundamental na resposta ao treino e à *performance* competitiva (Amy L. Heck et al., 2004). Por sua vez, o exercício pode influenciar a expressão genética e, do ponto de vista bioenergético, a capacidade de oxidação de substratos para obtenção de energia (Amy L. Heck et al., 2004).

As intervenções nutricionais são essenciais para que os atletas treinem melhor, alcancem *performances* superiores e melhorem a recuperação entre sessões de treino e competições, assunto que tem despertado o interesse dos investigadores ao longo dos anos (Travis et al., 2016). Está perfeitamente documentado que ingestões adequadas e atempadas de hidratos de carbono (HC) ou proteínas (PRO), representam estratégias nutricionais benéficas para o atleta (Kerksick et al., 2017). Mais recentemente, tem-se equacionado que a co-ingestão de HC e PRO (HC+PRO) resulta em melhorias na *performance*, numa reposição mais rápida das reservas de glicogénio, na diminuição do dano muscular e num balanço nitrogenado positivo (Kerksick et al., 2017).

Nos últimos anos, foi investigado o efeito da ingestão combinada de PRO e HC no contexto do exercício. Assim, a adição de PRO a bebidas contendo apenas HC diminui a glicemia e aumenta a resposta insulinémica (Roberts et al., 2013), diminui o esvaziamento gástrico, provavelmente mediado/associado à secreção de incretinas (Mignone et al., 2015) e aumenta a oxidação de fontes de HC extra-musculares durante o exercício subsequente, sem alterar a taxa de degradação do glicogénio muscular (Betts et al., 2008), o que se pode associar a níveis de *performance* superiores. Os efeitos relacionados com a eu-glicemia pós-prandial podem ser parcialmente explicados pelas alterações hormonais decorrentes da ingestão de PRO, induzidas pela elevação dos níveis de certos aminoácidos no sangue (Claessens et al., 2009). O aumento das concentrações sanguíneas de arginina, leucina e fenilalanina estimula as células β e α pancreáticas levando à libertação de insulina e glicagina, respetivamente (Loon et al., 2003; M.Kabadi, 1991). Como resultado desta dupla ação, ocorre entrada de glicose no músculo

pela ação da insulina (Manders et al., 2005) e, simultaneamente, estimulação da liberação de glicose pelo fígado por ação da glicagina (Jiang & Zhang, 2003), contribuindo assim para manter a eu-glicemia.

Do nosso conhecimento, todos os estudos realizados até ao momento analisaram a influência da co-ingestão de HC+PRO durante ou após o exercício em variáveis metabólicas e de desempenho, particularmente em ciclismo de longa duração (Ivy et al., 2003; Saunders et al., 2004; Saunders et al., 2007). Nomeadamente, os investigadores pretenderam analisar se a ingestão de HC+PRO durante ou imediatamente após o exercício alterava a *performance* durante o exercício (a intensidades de 45, 75 e 85% do consumo máximo de oxigénio ($VO_{2máx}$)) ou o dano muscular no período de recuperação de forma distinta da ingestão de HC apenas. Nesses estudos foi sugerido que a ingestão dos dois macronutrientes incrementaria o tempo até à exaustão e diminuiria o dano muscular. No entanto, a maioria dos estudos foram realizados em atletas de *endurance* e enfocaram intervenções nutricionais durante e após o exercício, sendo inexistente a literatura centrada no impacto de refeições, bebidas ou suplementos constituídas por HC+PRO consumidas antes do exercício na *performance* e em parâmetros fisiológicos e biomarcadores sanguíneos associados.

Até ao momento, as preocupações existentes sobre as intervenções nutricionais antes do exercício centralizaram-se nas possíveis implicações que o índice glicémico (IG) dos HC ou que o tempo de ingestão poderão ter na *performance* (Burdon et al., 2017; Ormsbee et al., 2014; Wong et al., 2017). Assim, o presente estudo pretende analisar se a ingestão de HC+PRO vs. HC influencia de forma distinta os parâmetros fisiológicos, os biomarcadores sanguíneos e a *performance* em atletas de atletismo da disciplina de meio-fundo, durante um exercício composto por períodos de intensidade progressiva até à exaustão, utilizando um desenho experimental randomizado duplo-cego e com inclusão de placebo.

Os resultados do presente estudo poderão contribuir para uma compreensão mais assertiva sobre a influência do consumo de HC+PRO antes do exercício,

visando um melhor desempenho e obtenção de benefícios adicionais da interação treino-nutrição para diferentes intensidades de exercício.

A presente dissertação está dividida em oito capítulos: o primeiro capítulo é composto por uma introdução; o segundo capítulo diz respeito à revisão da literatura; o terceiro capítulo reporta os objetivos gerais e específicos do trabalho; no quarto capítulo são apresentados os materiais e métodos utilizados; no quinto capítulo são apresentados os resultados obtidos; no sexto capítulo, discussão e conclusões, onde são discutidos os resultados obtidos tendo como suporte a literatura científica já existente e são reportadas as principais conclusões do estudo; no sétimo capítulo são referidas sugestões para trabalhos futuros; e no oitavo, e último capítulo, pode ser consultada a bibliografia utilizada para a elaboração desta dissertação.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Sistemas de produção de energia e *performance*

Com a realização de um determinado movimento ou atividade física, como por exemplo caminhar ou correr, verifica-se um incremento da taxa metabólica de inúmeras células do organismo, particularmente as musculares, com consequente aumento do gasto energético, para o qual é necessário trifosfato de adenosina (ATP) (Bassett et al., 2000). São vários os substratos e vias metabólicas que contribuem para sustentar, do ponto de vista energético, os diferentes tipos de exercício, e a intensidade e duração do exercício vão determinar a contribuição preferencial das vias metabólicas para a produção de energia (Hargreaves & Spriet, 2017).

A hidrólise do ATP leva a uma rápida libertação de energia para a contração muscular (Gastin, 2001). No entanto, uma vez que as reservas de ATP intramuscular são escassas ($\sim 5 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ de músculo), permitindo manter o exercício apenas durante poucos segundos (Hargreaves & Spriet, 2017), são necessários outros mecanismos para a sua produção (Gastin, 2001). Desta forma, é necessário a ativação de outras vias metabólicas para ressintetizar o ATP. De uma forma geral, existem três processos que operam coordenadamente entre si para satisfazer estas necessidades energéticas: (i) degradação da molécula fosfocreatina (PCr) por hidrólise, (ii) degradação anaeróbia e aeróbia do glicogénio muscular e (iii) oxidação de ácidos gordos e aminoácidos (Gastin, 2001). A produção de energia através da degradação do ATP, da PCr e do glicogénio muscular de forma anaeróbia é limitada, levando, nesta última, à acumulação de lactato (La^-) e provocando a diminuição da intensidade do exercício e até mesmo o seu término (Gastin, 2001). Dependendo da intensidade e das características do indivíduo, a degradação da PCr pode estar bastante ativa durante um exercício intenso de 5 a 10 segundos, para fornecer energia (Gastin, 2001; Nimmo & Ekblom, 2005). Se por um lado, a taxa de degradação da PCr diminui logo após 1-3 segundos de exercício, a produção de ATP pelo sistema glicolítico anaeróbio é mantida durante vários segundos (Gastin, 2001). É estimado que o metabolismo dos fosfagénios (ATP e PCr) fornece entre 20 a

30% de energia durante um exercício intenso de duração compreendida entre 2 a 3 minutos (Gastin, 2001). Quando a intensidade permanece elevada e a duração da corrida ultrapassa os 2–3 minutos, como em corridas de distâncias como 800m e 1500m, a principal limitação é, provavelmente, a diminuição do pH no músculo (Nimmo & Ekblom, 2005). Efetivamente, o aumento do consumo de ATP, o aumento da glicólise, o esgotamento do glicogénio, a hipercalemia e o fluxo de iões e acumulação de produtos metabólicos (H^+ , ADP, AMP, Pi) resultam numa acidose metabólica, contribuindo assim para o aparecimento da fadiga (Hargreaves & Spriet, 2017).

Por outro lado, o sistema de obtenção de energia de forma aeróbia é capaz de produzir quantidades superiores de ATP, estando associada à taxa de fosforilação oxidativa e à capacidade dos sistemas respiratório e cardiovascular para captar e transportar oxigénio (O_2) ao músculo-esquelético (Gastin, 2001). Durante o exercício submáximo, o metabolismo oxidativo dos HC e gorduras fornece quase a totalidade do ATP necessário (Hargreaves & Spriet, 2017). O glicogénio muscular e a glicose sanguínea, resultante da glicogenólise, da gliconeogénese e da absorção intestinal, bem como os ácidos gordos provenientes do tecido adiposo e triglicerídeos intramusculares, constituem os principais substratos para a oxidação (Hargreaves & Spriet, 2017).

A intensidade e duração do exercício, o nível de treino, as condições ambientais, a alimentação e o género influenciam a utilização do substrato (Hargreaves & Spriet, 2017). A taxa máxima de oxidação dos ácidos gordos intra- e extra-musculares ocorre a, aproximadamente, 60-65% do $VO_{2máx}$, sendo que em intensidades mais elevadas há um aumento da utilização de glicose sanguínea e glicogénio muscular (Hargreaves & Spriet, 2017). O aumento da utilização de glicose pelo músculo-esquelético é acompanhado pelo aumento da degradação de glicogénio e libertação de glicose pelo fígado, devido à glicogenólise hepática que ocorre no início do exercício (Hargreaves & Spriet, 2017). Em situações de jejum prolongado, e com o aumento da duração do exercício, verifica-se uma maior contribuição da gliconeogénese (Hargreaves & Spriet, 2017). Durante exercícios prolongados a uma intensidade de 75% do $VO_{2máx}$, ocorre diminuição da glicogenólise e lipólise musculares, aumento da utilização de glicose pelo

músculo-esquelético e aumento progressivo da contribuição da oxidação de ácidos gordos (Hargreaves & Spriet, 2017).

Importa também referir que nenhum dos três sistemas para obtenção de energia é exclusivo durante um esforço. No que diz respeito à corrida, o sistema anaeróbio é o predominante durante uma prova de 200m, ao passo que nos 3000m é o sistema aeróbio (Duffield et al., 2005; Gastin, 2001). Assim, quanto maior for a distância e, por conseguinte, a duração do esforço, maior será a contribuição do sistema aeróbio para obtenção de energia.

Na perspetiva do treino desportivo com vista à melhoria e otimização da *performance*, é manifestamente importante perceber as contribuições energéticas para diferentes intensidades e durações do exercício, de forma a estruturar e planificar o treino (Duffield et al., 2005). Assim sendo, torna-se essencial que a duração, intensidade e frequência das sessões de treino sejam convenientemente ajustadas por forma a contribuir para a melhoria de indicadores importantes no rendimento aeróbio, incluindo o $VO_{2máx}$, a economia de corrida e o limiar anaeróbio (LAn) (Burnley & Jones, 2007).

2.2. Indicadores fisiológicos associados à *performance de endurance*

De entre os diferentes indicadores físicos e fisiológicos associados à *performance de endurance*, destacam-se o $VO_{2máx}$, assim como a cinética a ele associada, o LAn e a eficiência/economia de corrida.

O $VO_{2máx}$ é um dos parâmetros mais estudados (Borgen, 2017) e, desde a sua descoberta em 1920, tem sido bastante valorizado pela comunidade clínica e científica (Bassett et al., 2000; Schaun, 2017). Este parâmetro fisiológico traduz a potência máxima aeróbia e taxa máxima de consumo de O_2 durante um exercício intenso, apresentando valores mais elevados em atletas bem treinados (Bassett et al., 2000). Na literatura científica, o aumento do $VO_{2máx}$ é uma das formas mais comuns para demonstrar o efeito do treino e para o seu planeamento (Bassett et al., 2000). Importa também referir que existem fatores fisiológicos que afetam o $VO_{2máx}$ e, por conseguinte, a *performance*. São eles: a capacidade de difusão pulmonar, o débito cardíaco máximo, a capacidade de transporte de O_2 do sangue, as características fenotípicas do músculo-

esquelético, bem como a economia de corrida (Bassett et al., 2000). Um elevado $\text{VO}_{2\text{máx}}$ é um pré-requisito para o sucesso em corredores de média a longas distâncias, o qual está limitado, fundamentalmente, pela capacidade do sistema cardiorrespiratório em transportar O_2 aos músculos (Bassett et al., 2000). Em desportos de *endurance*, de que é exemplo a corrida, o $\text{VO}_{2\text{máx}}$ desempenha um papel fundamental na *performance*; uma maratona pode ser corrida a aproximadamente 75-85% $\text{VO}_{2\text{máx}}$, uma corrida de 10km entre 90-100% $\text{VO}_{2\text{máx}}$ e os 5km podem ser corridos perto do $\text{VO}_{2\text{máx}}$ (Joyner & Coyle, 2008).

Durante os últimos 50 anos, a relação entre a carga e as concentrações de La^- sanguíneo ($[\text{La}^-]$), expressas através do LAn, tem permitido avaliar a *performance* de atletas de *endurance* (Faude et al., 2009). A medição da $[\text{La}^-]$ durante um exercício de intensidade incremental permite avaliar o efeito do treino e monitorizá-lo, definir intensidades de corrida para os treinos e competições, bem como prever o estado de forma do atleta (Bourdon, 2000).

Em 1970 surgiu o conceito de transição aeróbio-anaeróbio, expresso através do indicador LAn, para avaliar a *performance*, servindo de suporte para o planeamento do treino (Faude et al., 2009). Por definição, o LAn corresponde ao valor de La^- e correspondente carga externa, abaixo do qual se verifica um equilíbrio entre a produção e a eliminação do referido metabolito, possibilitando a realização de exercício durante um tempo prolongado (Faude et al., 2009). Ou seja, corresponde à intensidade de exercício em que a taxa de remoção do La^- equivale à sua produção (Baldari & Guidetti, 2000; Faude et al., 2009). O valor da $[\text{La}^-]$ mais elevado no sangue em que ocorre esse equilíbrio (*maximal lactate steady state: MaxLass* – estado de equilíbrio máximo) (Santos & Santos, 2002) não é necessariamente 4mmol/L, pois pode variar consideravelmente entre indivíduos (Faude et al., 2009). A esta intensidade, em que se verifica o *steady state*, o exercício pode durar até 45-60 minutos sem grande contribuição do metabolismo anaeróbio (Faude et al., 2009). Para durações de exercício mais prolongadas, como por exemplo a maratona, os atletas são capazes de correr ao LAn, ao passo que os 10km e a meia-maratona podem ser corridos a uma velocidade situada acima deste limiar (Burnley & Jones, 2007). Intensidades

acima do *steady state* são utilizadas para a realização de treino intervalado (Faude et al., 2009).

Perceber as contribuições energéticas para diferentes intensidades e duração do exercício e saber avaliar parâmetros fisiológicos capazes de nos indicarem qual a *performance* atual do atleta são aspetos fundamentais para atingir níveis de *performance* máximos.

Além da contribuição do conhecimento da bioenergética do exercício e da utilização da informação decorrente dos diferentes indicadores fisiológicos e físicos no treino para o desenvolvimento da *performance* dos atletas, é hoje claro que o tipo de alimentação e suplementação e o seu momento em articulação com o exercício são, igualmente, decisivas para a otimização da *performance*.

2.3. Nutrição e *performance*

As reservas de glicogénio muscular são essenciais para o desempenho durante exercícios prolongados de moderada a alta intensidade (Ivy et al., 2003). Quando as reservas de glicogénio muscular e hepático se esgotam, por exemplo durante um exercício prolongado, e a glicose sanguínea não é suficiente, a capacidade para manter o exercício ou a sua intensidade diminuem (Amy L. Heck et al., 2004; Hargreaves & Spriet, 2017; Ivy et al., 2003).

Por conseguinte, tem sido bem estudada a importância dos HC para a *performance* do atleta, pois são um substrato utilizado durante o exercício por inúmeros tecidos, incluindo o cérebro e músculo-esquelético (Marquet et al., 2016). Dado que as reservas são limitadas, a ingestão de HC e o seu armazenamento sob a forma de glicogénio (~80 – 100g no fígado e 300 – 400g no músculo-esquelético) são fundamentais para a *performance* do atleta para exercícios de moderada a alta intensidade (65 – 80% do $VO_{2\text{máx}}$) (Kerksick et al., 2017).

As recomendações para a ingestão deste macronutriente devem ter em conta o programa de treino e/ou competição (intensidade, duração e frequência) e o tempo de recuperação entre sessões de treino/competições, de forma a maximizar as reservas de glicogénio que se refletirá num melhor desempenho por parte do atleta (Burke et al., 2011; Burke et al., 2004; Kerksick et al., 2017).

As recomendações de ingestão diária de HC variam consideravelmente mediante a intensidade e duração do exercício, apresentando valores de ingestão mais baixos para exercícios de baixa intensidade (3-5g/kg de peso corporal por dia (g/kg/d)), enquanto que as recomendações mais que duplicam (8-12g/kg/d) para exercícios de moderada a alta intensidade (>70% $\text{VO}_{2\text{máx}}$) com duração superior a 4-5h (Burke et al., 2011; Kerksick et al., 2017). Para exercícios de moderada intensidade com duração de 1h e para exercícios de moderada a alta intensidade com duração compreendida entre 1-3h, as recomendações são 5-7g/kg/d e 6-10g/kg/d, respetivamente (Burke et al., 2011). É importante, também, maximizar as reservas de glicogénio muscular nos dias anteriores a competições de duração superior a 1h. Quando a duração do evento competitivo está compreendida entre 60 a 90 minutos de intensidade moderada a elevada (65-80% $\text{VO}_{2\text{máx}}$) importa, nas 24h anteriores à competição, aumentar a ingestão de HC para 7-12g/kg/d (Burke et al., 2011). Para durações superiores, o *carbloading* deverá ser realizado durante as 36-48h anteriores ao momento competitivo e com maior ingestão de HC (10-12g/kg/d) (Burke et al., 2011).

As recomendações nutricionais para o treino/competição e recuperação incluem ainda estratégias que disponibilizem HC antes, durante e após o exercício, com o objetivo de melhorar a *performance* e a recuperação. A ingestão de HC antes do exercício (1-4g/kg, 1-4h antes) melhora a *performance*, uma vez que contribui para maximizar as reservas de glicogénio muscular e hepático (Burke et al., 2011; Chryssanthoulos et al., 2002; Kerksick et al., 2017; Tokmakidis & Karamanolis, 2008). Optar por ingerir alimentos de baixo IG ($\text{IG} \leq 55$) na refeição anterior ao exercício pode trazer vantagens para o desempenho do atleta, especialmente se não existir oportunidade para ingerir HC durante o esforço ou se o atleta não tolera a sua ingestão devido ao risco de distúrbios gastrointestinais (Burdon et al., 2017; Burke et al., 2011; Kirwan et al., 2001). Contudo, importa referir que o IG da refeição varia não só com o tipo de HC que constitui o alimento, mas também com o tempo de cozedura, textura (sólida ou líquida) e outros macronutrientes presentes na refeição (gordura e PRO) (Burdon et al., 2017). Além disso, parece também existir uma significativa variabilidade individual (Zeevi et al., 2015).

Durante exercícios de duração inferior a 1h, bochechar uma bebida com HC (sem engolir) cerca de 4 a 12 vezes durante 5 a 10 segundos pode melhorar a *performance* (Burke et al., 2011; Carter et al., 2004; Chambers et al., 2009; Jeukendrup & Chambers, 2010; Oliveira & Burini, 2014; Silva et al., 2014). Tal efeito deve-se à detecção dos HC por recetores presentes na cavidade bucal que ativam zonas cerebrais associadas à sensação de recompensa e prazer, levando a uma melhoria da *performance* (Jeukendrup & Chambers, 2010; Silva et al., 2014).

Quando os exercícios são mais prolongados ($\geq 1h$), a ingestão de HC durante o mesmo tem um efeito ergogénico, pois constituem uma fonte de energia exógena, permitindo poupar as reservas de glicogénio, prevenir a hipoglicemia e manter uma elevada taxa de oxidação de HC exógenos, de forma a manter a intensidade do exercício e atrasar o aparecimento da fadiga (Burke et al., 2011; Jeukendrup, 2008). As recomendações para a ingestão de HC durante um exercício de longa duração variam entre 30-60g/h para exercícios de duração compreendida entre 1h e 2h30, sendo que para durações superiores é recomendada uma ingestão de 90g/h (Cermak & Loon, 2013; Coyle, 2004; Travis et al., 2016). A taxa de oxidação de HC exógenos está limitada pela capacidade de absorção intestinal, que pode ser aumentada pela ingestão de diferentes tipos de HC absorvidos por diferentes transportadores (glicose pelo SGLT1 e frutose pelo GLUT-5) (Jeukendrup, 2011). Segundo Jentjens e colaboradores, a ingestão de 0,6g/min de frutose juntamente com 1,2g/min de glicose leva a uma maior taxa de oxidação de HC exógenos (1,26g/min), comparativamente com a ingestão de glicose apenas (~0,8g/min) (Jentjens et al., 2004). A ingestão de frutose-glicose num rácio de 0,8:1 evidenciou maior eficiência na oxidação exógena e menor taxa de oxidação das reservas endógenas (O'Brien et al., 2013). A literatura reporta, igualmente, que a concentração de HC e eletrólitos deverá ser 6-8% e ingerida a cada 10-15 minutos durante o exercício (Kerksick et al., 2017). De forma a aumentar a capacidade de absorção de HC ao nível intestinal e reduzir ou evitar distúrbios gastrointestinais, é recomendado 'treinar' o intestino através do aumento da ingestão diária de HC, bem como através da

sua ingestão durante o treino (Burke et al., 2011; Jeukendrup, 2008, 2011; Oliveira & Burini, 2014).

Vários estudos têm analisado o efeito da ingestão de HC após o exercício no que respeita à reposição do glicogénio muscular (Adamo et al., 1998; Burke et al., 2017; Costill et al., 1981; Ivy, Katz, et al., 1988; Ivy, Lee, et al., 1988). Fatores como a quantidade, o momento da ingestão, a frequência e o tipo de HC ingeridos podem influenciar a taxa de re-síntese de glicogénio muscular (Burke et al., 2004; Jentjens & Jeukendrup, 2003). Quando o intervalo entre sessões de treino ou competições é de 4 a 8h, a necessidade de repor o glicogénio muscular é premente, de forma a garantir um melhor desempenho durante o exercício subsequente. Taxas mais elevadas de repleção do glicogénio muscular ocorrem nas primeiras horas após o exercício devido à ativação da síntese do glicogénio (pela depleção do glicogénio), ao aumento da sensibilidade à insulina (pelo exercício) e à maior permeabilidade do músculo à glicose (Burke et al., 2004; Burke et al., 2017). Assim, a ingestão de 0,6 a 1,0g/kg nos 30 minutos após o término do exercício, e a cada 2h durante 4 a 6h, permite uma reposição do glicogénio muscular de forma mais eficaz (Kerksick et al., 2017). A adição de PRO (0,2-0,4g/kg/h) pode também desempenhar um papel importante nos mecanismos de repleção do glicogénio muscular, em situações em que a ingestão de HC é de apenas 0,8g/kg/h (Jentjens & Jeukendrup, 2003; Kerksick et al., 2017; Loon, Saris, Kruijshoop, et al., 2000). Quando a ingestão de HC é superior (1,2g/kg/h), a adição de PRO não parece traduzir-se numa vantagem adicional na reposição do glicogénio muscular (Jentjens & Jeukendrup, 2003; Loon, Saris, Kruijshoop, et al., 2000). Ingestões superiores, 1,2g/kg a cada 30 minutos, durante as 3h30min após o exercício, possibilitam, igualmente, a reposição de glicogénio muscular a uma taxa elevada (Kerksick et al., 2017). No entanto, quando o período de recuperação é longo (8-24h), é pouco relevante a ingestão de HC imediatamente após o exercício (Burke et al., 2004; Donaldson et al., 2010). No que diz respeito ao tipo de HC, uma mistura de glicose e frutose é mais eficaz na reposição do glicogénio muscular e hepático e com menor risco de causar desconforto gastrointestinal (DGI) quando a taxa de ingestão de HC se aproxima ou ultrapassa a capacidade de absorção intestinal de glicose

(~1,2g/min) (Alghannam et al., 2018; Gonzalez et al., 2017). Assim, quando o objetivo é repor as reservas de glicogénio num período inferior a 24h, e a taxa de ingestão de HC é superior a 1,2g/kg/h, a combinação de glicose e frutose é vantajosa (Gonzalez et al., 2017). O IG também influencia a taxa de síntese de glicogénio muscular (Jentjens & Jeukendrup, 2003). A inclusão de HC de alto IG (>70) permite uma maior reposição das reservas de glicogénio muscular, comparativamente com HC de baixo IG (Jentjens & Jeukendrup, 2003; Kerksick et al., 2017). Desta forma, em períodos de recuperação curtos (<6h), a sua ingestão é mais indicada quando comparada com HC de baixo IG, uma vez que estes parecem ser menos eficazes na recuperação do glicogénio muscular devido à mais difícil digestão (Burke et al., 2017; Jentjens & Jeukendrup, 2003; Ranchordas et al., 2017). A ingestão de HC com cafeína (3-8mg/kg) após o exercício contribui também para maximizar a síntese de glicogénio muscular em curtos períodos de recuperação (<4h) (Kerksick et al., 2017; Pedersen et al., 2008). No entanto, esta estratégia não deve ser realizada no final do dia, pois poderá interferir com a qualidade do sono (Ranchordas et al., 2017).

Está bem descrito na literatura que a ingestão de PRO é importante para promover a síntese e aumento da massa muscular (Cermak et al., 2012; Drummond et al., 2009; Mitchell et al., 2015; Schoenfeld et al., 2013; Witard et al., 2014), prevenir a sua perda (Krieger et al., 2006; Layman et al., 2005; Stijn Soenen, 2013; Weijs & Wolfe, 2016; Wycherley et al., 2012), diminuir a sensação de desconforto muscular e melhorar a recuperação da função muscular (Buckley et al., 2010; Cockburn et al., 2008; Coyle et al., 2012; Pasiakos et al., 2014; Sousa et al., 2014), bem como aumentar a força/potência (Candow et al., 2006; Cermak et al., 2012; Schoenfeld et al., 2013; Willoughby et al., 2007).

A fonte de PRO tem influência no aumento da massa muscular e força em função do seu perfil de aminoácidos essenciais, nomeadamente de leucina que estimula a síntese proteica muscular (SPM) (Pasiakos & McClung, 2011)) e da taxa de digestão e absorção (Jäger et al., 2017; Morifuji et al., 2010). Proteínas de fácil digestão e com elevado teor em aminoácidos essenciais (10-12g de aminoácidos essenciais, dos quais 700-3000mg de leucina, por 20-40g de proteína) são mais eficazes na estimulação da SPM (Jäger et al., 2017). O perfil de aminoácidos

difere consoante o tipo de PRO e, no que diz respeito ao teor em leucina, este aminoácido encontra-se em concentrações superiores na PRO *whey* e em menor na PRO de soja (Hulmi et al., 2010). Embora o perfil de aminoácidos seja importante para promover a SPM, a quantidade de PRO ingerida durante o dia e a sua distribuição têm influência superior. Atletas saudáveis com objetivo de aumentar ou manter a massa muscular deverão promover uma ingestão proteica de 1,4 a 2,0g/kg/d, a qual deverá estar aumentada (2,3-3,1g/kg/d) durante períodos de baixa ingestão alimentar, de forma a preservar a massa muscular (Egan, 2016; Jäger et al., 2017). Durante períodos de lesão, as recomendações variam entre 1,6 a 2,5g/kg/d (Egan, 2016). A sua ingestão ao longo do dia deverá ser distribuída entre 4 a 6 refeições com intervalo de 2 a 4 horas, com 0,25 a 0,4g/kg por refeição de forma a maximizar o seu contributo para estimular a SPM (Egan, 2016; Jäger et al., 2017).

O exercício de força pode aumentar a SPM até 24-36h (em sujeitos treinados) ou até 48h (em sujeitos não treinados) (Kerksick & Leutholtz, 2005). Contudo, após o exercício e na ausência de ingestão alimentar, pode verificar-se um balanço azotado negativo, ou seja, degradação de massa muscular (Tipton et al., 1999). Como mencionado, a ingestão de PRO após o exercício estimula a SPM, contribuindo para a melhoria da resposta adaptativa do músculo-esquelético ao exercício (Trommelen & Loon, 2016). Desta forma, a ingestão de PRO até 24h após o exercício induz uma SPM superior, comparativamente com a ingestão após esse período (Jäger et al., 2017; Kerksick & Leutholtz, 2005). A adição de HC não se traduz numa vantagem adicional quando ocorre uma ingestão de adequada de proteína (~25g), uma vez que esta quantidade leva a concentrações de aminoácidos e insulina plasmática suficientes para estimular a SPM (Abdulla et al., 2016; Escobar et al., 2017; STAPLES et al., 2011).

Nos últimos anos, vários estudos analisaram o efeito que a adição de PRO a bebidas ou suplementos com HC durante e após o exercício tem na *performance*, no metabolismo e em parâmetros fisiológicos (McLellan et al., 2014; Ormsbee et al., 2014).

A ingestão de PRO conduz ao aumento da glicagina plasmática e a um ligeiro aumento de insulina, sendo este superior com a co-ingestão de HC (Betts et al., 2005; Gannon et al., 1984; Loon, Saris, Kruijshoop, et al., 2000; Rabinowitz et al., 1966). O aumento da concentração de aminoácidos no sangue, após a ingestão de PRO, é responsável pela estimulação das células β e α do pâncreas, resultando na secreção de insulina e glicagina, respetivamente (Bolea et al., 1997; Calbet & MacLean, 2002; Hermans et al., 1987; Loon, Saris, Verhagen, et al., 2000; M.Kabadi, 1991; Smith et al., 1997). Entre os aminoácidos, a isoleucina, a leucina, a lisina, a treonina e a valina são os que apresentam um efeito insulínico superior (Morifuji et al., 2010). A insulina e a glicagina têm como principal função fisiológica a regulação da concentração de glicose no sangue (Hayashi & Seino, 2018). A insulina estimula a captação de glicose nos tecidos músculo-esquelético e tecido adiposo (Bolea et al., 1997) enquanto que a glicagina aumenta a glicemia no sangue devido à produção de glicose hepática (Jiang & Zhang, 2003), permitindo desta forma manter a glicemia (Ormsbee et al., 2014). A glicagina está envolvida na regulação da concentração de glicose, uma vez que estimula a glicogenólise e a gliconeogénese no fígado, levando ao aumento da concentração de glicose no sangue (Hayashi & Seino, 2018). Alguns estudos têm mostrado que quando a PRO é adicionada aos HC pode reduzir a resposta glicémica e aumentar a resposta insulínica (Claessens et al., 2009; Claessens et al., 2007; Loon, Saris, Verhagen, et al., 2000; Roberts et al., 2013), através de vários mecanismos, como o aumento da insulina, da secreção de incretinas e a diminuição do esvaziamento gástrico (Mignone et al., 2015). Além disso, a co-ingestão de HC+PRO pode aumentar a oxidação dos HC exógenos (extra-muscular) e reduzir a oxidação dos ácidos gordos livres (AGLs), comparativamente com a ingestão isolada de HC (Betts et al., 2008). A combinação destes dois macronutrientes é utilizada como uma estratégia para aumentar a *performance*, promover a reposição do glicogénio, diminuir o dano muscular e promover um balanço azotado positivo (Kerksick et al., 2017). Alguns estudos indicam que a junção de PRO a HC pode melhorar a síntese do glicogénio muscular após o exercício (Hall et al., 2000; Ivy et al., 2002; Loon, Saris, Kruijshoop, et al., 2000; Williams et al., 2003), diminuir os marcadores do

dano e dor muscular (Hall et al., 2013; Qin et al., 2017; Saunders et al., 2004; Saunders et al., 2007; Saunders et al., 2009), aumentar a síntese de PRO e diminuir a sua degradação (Koopman et al., 2004), fornecer precursores para as reações anapleróticas necessárias para manter os intermediários do ciclo de Krebs no músculo-esquelético (Ivy et al., 2003), contribuir para uma utilização mais eficiente das reservas de glicogénio muscular durante o exercício (Ivy et al., 2003) e manter os níveis de aminoácidos presentes no plasma durante o exercício, de forma a atrasar a percepção da fadiga ao nível do sistema nervoso central (Blomstrand, 2006; Ivy et al., 2003).

Durante o exercício, a adição de PRO aos HC pode fornecer uma ajuda ergogénica quando a disponibilidade de HC é inferior a 60g/h (Ferguson-Stegall et al., 2010; Ivy et al., 2003; McCleave et al., 2011; Saunders et al., 2007). Por outro lado, quando a sua taxa de utilização/disponibilidade é igual ou superior a 60g/h, a adição de PRO não apresenta um efeito ergogénico (Essen & Gibala, 2006). Quando a ingestão de HC é $\geq 1,0\text{g/kg/h}$, a adição de PRO, apesar de melhorar a recuperação do glicogénio muscular, não melhorou a *performance* durante o exercício subsequente (Berardi et al., 2006; Betts et al., 2007). No entanto, em pelo menos dois estudos, verificou-se uma recuperação do glicogénio muscular mais eficaz e uma melhoria na *performance* com o consumo de HC+PRO a uma taxa superior a $1,0\text{g/kg/h}$ (Berardi et al., 2008; Niles et al., 2001). Por outro lado, quando a ingestão de HC é inferior ($<1,0\text{g/kg/h}$), a adição de PRO permite uma melhor recuperação e melhor *performance* no exercício seguinte (Betts et al., 2007; Williams et al., 2003). Em pelo menos um estudo, não se verificaram diferenças significativas no tempo até à exaustão, realizado a uma intensidade de 85% $\text{VO}_{2\text{máx}}$, entre os grupos que consumiram durante um período de recuperação de 4h HC+PRO e aqueles que consumiram apenas HC (Grupo A: $1,2\text{g/kg/h}$ de HC apenas ou com adição de $0,2\text{ g/kg/h}$ de PRO e Grupo B: $0,8\text{g/kg/h}$ de HC apenas ou com adição de $0,1\text{ g/kg/h}$ de PRO) (Betts et al., 2005). Contudo, e apesar das diferenças não serem significativas, os grupos que ingeriram HC+PRO correram durante mais 210 segundos (no grupo A) e 90 segundos (no grupo B). Apesar de alguns estudos reportarem que a adição de PRO a uma bebida ou suplemento de HC melhora a *performance*, são

necessários mais estudos para determinar se esse efeito se deveu à adição de PRO ou ao valor energético superior da bebida com PRO e HC (Saunders et al., 2004; Saunders et al., 2009).

Até ao presente, poucos estudos têm investigado o efeito que a adição de PRO aos HC, ingerida antes do exercício, tem na *performance* (Ormsbee et al., 2014), bem como em indicadores fisiológicos e bioquímicos associados ao metabolismo dos sujeitos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O presente estudo teve como principal objetivo avaliar o efeito da adição de PRO a uma bebida com HC ingerida antes do exercício, na *performance*, em parâmetros fisiológicos e biomarcadores sanguíneos em resposta a um exercício incremental constituído por várias intensidades/patamares de carga, em corredores de meio-fundo.

3.1.1. Objetivos específicos

Avaliar, comparativamente, de forma randomizada e duplamente cega e com inclusão de placebo (PLA), o impacto de duas bebidas diferentes [HC (1,0g/kg) e HC+PRO (0,75+0,25g/kg)]:

- em parâmetros fisiológicos, como o consumo $VO_{2máx}$, carga ao $VO_{2máx}$, LAn, quociente respiratório (QR) e frequência cardíaca (FC) observados nas diferentes intensidades de carga;
- em biomarcadores sanguíneos associados ao metabolismo (La^- , glicose, insulina, AGLs e glicagina);
- no DGI e percepção subjetiva de esforço (PSE).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Caracterização da amostra

Dez atletas (sete masculinos e três femininos) da modalidade de atletismo, disciplina de meio-fundo, que realizavam seis ou mais sessões de treino por semana, participaram voluntariamente no presente estudo.

Todos os sujeitos eram saudáveis e apresentavam idades compreendidas entre os 20 e os 34 anos (masculino $24,7 \pm 5,7$; feminino $24,3 \pm 1,5$; Média \pm Desvio padrão – $M \pm D.p.$).

Foram informados dos procedimentos do estudo e possíveis riscos associados, tendo assinado um consentimento informado.

4.2. Protocolo experimental

Para limitar o potencial impacto do ritmo circadiano, os testes foram realizados à mesma hora para cada participante. Foram testados, de forma randomizada e duplamente-cega, em três ocasiões (HC; HC+PRO; PLA) com 2 a 3 dias de intervalo entre testes. Os participantes chegaram ao laboratório de manhã com pelo menos 10 horas de jejum e, após 15 minutos de repouso, foi recolhida uma amostra de sangue venoso. De seguida, os participantes ingeriram a bebida e, 30 minutos após a ingestão, foi recolhida nova amostra de sangue venoso e capilar.

Os testes foram realizados numa passadeira (*h/p/cosmos model Quasar, Munich/Germany*) com 0% de declive. O protocolo de corrida incremental consistiu em pelo menos sete patamares com duração de 4 minutos e intervalo de 1 minuto entre patamares, sendo que os patamares seguintes poderiam ser completados até ao fim ou o teste prosseguir até à exaustão. A velocidade inicial foi definida de acordo com a *performance* de cada participante, com incrementos de 1 km/h, de forma sucessiva, nos patamares seguintes (adaptado de (Sousa et al., 2015)). Foram realizadas recolhas adicionais de sangue venoso no final dos patamares 3 e 7. Foram colhidas amostras de sangue capilar para determinar a $[La^-]$ durante todos os intervalos entre os patamares, bem como no final do teste. O DGI e PSE foram registados no final de cada patamar. Os

participantes foram pesados antes e após cada sessão realizada. A temperatura do laboratório foi mantida a cerca de 21°C.

A figura 1 esquematiza o protocolo nas condições descritas.

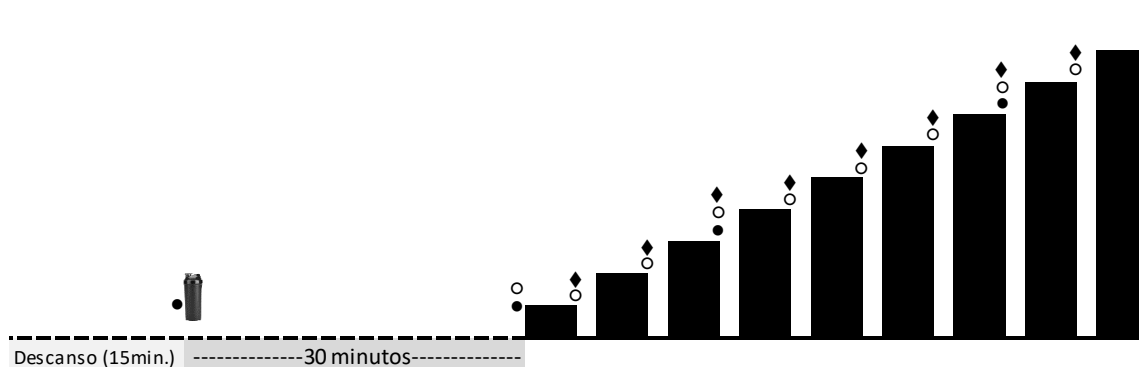


Figura 1. Protocolo experimental. Após 15 minutos de descanso os participantes ingeriram uma bebida (HC; HC+PRO ou PLA) e 30 minutos após, o exercício começou. O protocolo de corrida incremental consistiu em pelo menos 7 patamares com duração de 4 minuto e intervalo de 1 minuto entre patamares e, o(s) próximo(s) patamar(es) poderia(m) ser completado(s) até ao fim ou até à exaustão. A velocidade inicial foi determinada de acordo com a *performance* do participante e houve um aumento de 1 km/h de forma sucessiva entre patamares. ● Recolha de sangue venoso | ○ Lactato | ◆ Avaliação do DGI e PSE.

4.3. Avaliação antropométrica

Na semana anterior ao início dos testes foi realizada a avaliação antropométrica. Para tal foi medida a altura, o peso corporal, perímetros (braço, cintura, anca, coxa e gêmeo) e pregas cutâneas (tricipital, abdominal, crural e geminal) recorrendo ao estadiómetro portátil Seca® model 213 (*Hamburgo, Deutschland*), à balança plana Seca® model 869 (*Hamburg, Deutschland*), ao lipocalibrador *harpenden* (*Model HSB-BI, West Sussex, UK*) e à fita ergonómica de medição de circunferência Seca® modelo 203 (*Hamburg, Deutschland*). A percentagem de massa gorda foi estimada pela aplicação da equação de Evans (Evans et al., 2005) e a massa muscular foi estimada pela equação de Lee (Lee et al., 2000).

4.4. Nutrição e atividade física

Durante o estudo, os participantes mantiveram o treino planeado pelo seu treinador, encontrando-se no período de transição entre pista coberta e pistar ar livre. No entanto, foi-lhes pedido que evitassem qualquer tipo de exercício exaustivo nos dois dias anteriores a cada teste e foram instruídos a manter a mesma rotina durante o estudo. O volume e intensidade das sessões de treino nos dois dias anteriores a cada teste foi avaliado através da utilização de um relógio com GPS.

Os participantes foram alertados para não consumirem álcool e tabaco nos dois dias anteriores a cada teste, para manterem a sua rotina alimentar durante esse período e a não experimentarem novos alimentos e bebidas. Foi entregue uma folha de registo para anotarem tudo o que comiam e bebiam nos dois dias anteriores, bem como os suplementos que estivessem a tomar. Foi utilizado o software Nutrium® (*Healthium* 2018, Braga, Portugal) para análise nutricional.

4.5. Protocolo de suplementação

Como referido, foram fornecidas três bebidas (HC; HC+PRO; PLA) em volumes iguais (400mL): **(a)** HC (dextrose; 1,0g/kg), **(b)** HC+PRO (dextrose + *whey* hidrolisada; 0,75 + 0,25g/kg, respetivamente) e **(c)** placebo (sem HC, PRO ou gordura). Todas as bebidas continham 2,5mL de aromatizante (*Flavdrops* da marca My Protein) de sabor a morango no sentido de homogeneizar os paladares. As bebidas foram fornecidas de forma aleatória e duplamente cega. A tabela 1 mostra a composição e ingredientes de cada suplemento.

Tabela 1. Composição e ingredientes de cada suplemento

Ingredientes (por 100g)	Suplementos		
	Aromatizante	Dextrose	Proteína <i>whey</i> hidrolisada
Energia (kJ/kcal)	0/0	1700/400	1588/375
Gordura (g)	0,0	0,0	4,7
da qual saturada (g)	0,0	0,0	1,6
Hidratos de carbono (g)	0,0	100,0	3,2
dos quais açúcares (g)	0,0	100,0	3,2
Fibra (g)	0,0	0,0	0,0
Proteína (g)	0,0	0,0	80,0
Sal (g)	0,0	<0,01	1,5
			<u>Aminoácidos Essenciais (g)</u> Histidina (1,9) Isoleucina (6,2) Leucina (11,2) Lisina (9,9) Metionina (2,4) Fenilalanina (3,6) Treonina (6,9) Triptopano (2,1) Valina (6,1) <u>Não essenciais (g)</u> Alanina (5,2) Arginina (2,6) Ácido aspártico (11,2) Cistina (2,4) Glutâmico (18,4) Glicina (1,9) Prolina (6,3) Serina (5,1) Tirosina (3,2)
INGREDIENTES	Aroma natural, adoçante (glicosídeos de esteviol).	Dextrose (100%)	Proteína <i>whey</i> hidrolisada (leite) (81%), emulsificante (lecitina de soja)

4.6. Protocolo de exercício

Os participantes realizaram pelo menos sete patamares com duração de 4 minutos cada e intervalo de 1 minuto entre patamares. Para determinar a velocidade do sétimo patamar, cada participante referiu o seu melhor tempo aos 3000m naquele momento da época desportiva. A velocidade dos patamares anteriores foi calculada reduzindo 1 km/h de forma sucessiva e para o oitavo e nono patamar foi acrescentado 1 km/h e 2 km/h, respetivamente, em relação ao sétimo patamar (adaptado de (Sousa et al., 2015)).

4.7. Indicadores decorrentes da análise das trocas gasosas e frequência cardíaca

As trocas gasosas foram registadas continuamente ao longo de cada teste utilizando máscaras oronasais flexíveis *7450 Series V2 Mask* (Hans Rudolph, Inc., USA). A turbina foi inserida na máscara, juntamente com o fluxómetro e respetivos cabos de conexão. O tamanho da máscara foi selecionado de acordo com o tamanho e a forma da face do participante, bem como o nível de conforto fornecido. O volume, em mililitros, do espaço morto das máscaras (88mL na XS, 99mL na S e 125mL na M) foi inserido no sistema informático antes do início do teste, juntamente com os dados do participante (código, altura, peso e idade). A FC foi monitorizada continuamente por um cardiófrequencímetro (Polar *Wearlink*, Kempele, Finlândia) que emitia os dados através de telemetria ao oxímetro *Oxycon Pro Metabolic Cart* (Jaeger, CareFusion, Alemanha), com o sistema JLAB, versão 5.30.0.155. A média dos últimos 30 segundos registados em cada patamar foram utilizados para determinar a FC, bem como o QR.

4.8. Consumo máximo de oxigénio

Foi determinado o $VO_{2\text{máx}}$ para cada participante nas três condições (HC; HC+PRO e PLA), tendo por base os seguintes critérios (Howley et al., 1995): 1) ocorrer o *plateau* do consumo de O_2 , com aumento $>2,1\text{ml/min/kg}$ entre os dois últimos patamares de corrida; 2) elevados níveis de $[La^-]$ ($[La^-] \geq 8\text{mmol/l}$), elevado QR ($\geq 1,1$), elevada FC ($>90\%$ de $[220-\text{idade}]$) e momento de exaustão. A

velocidade ao $VO_{2\text{máx}}$ ($vVO_{2\text{máx}}$) correspondeu ao primeiro momento onde ocorre o *plateau* do consumo de O_2 .

4.9. Limiar anaeróbio

O LAn foi determinado para cada participante nas três condições (HC; HC+PRO e PLA). Para tal, analisaram-se as regressões lineares e exponencial referentes à $[La^-]$ correspondente a cada velocidade de corrida (Fernandes et al., 2011). A interseção da curva de La^- (regressão exponencial) com a regressão linear correspondeu ao LAn.

4.10. Lactato sanguíneo, glicose, insulina, glicagina e ácidos gordos livres

Para avaliar as $[La^-]$ foram recolhidas amostras de sangue capilar no lóbulo da orelha antes do exercício (e após a ingestão da bebida), no final de cada patamar e imediatamente após a exaustão. Foi utilizado o analisador *Lactate Pro2* (Arkay, Inc, Kyoto, Japan) para a determinação.

O sangue venoso foi colhido da veia antecubital com uma agulha *butterfly* para um tubo *BD Vacutainer® K3E 5,5mg* (contendo EDTA, para glicagina) e para um tubo *BD Vacutainer® SST™ II Advance* (com ativador de coágulo e separador de gel, para glicose, insulina e AGLs). As amostras de sangue foram centrifugadas a 2000g numa centrífuga (L500, Hunan, China) durante 10 minutos à temperatura ambiente. O plasma foi separado e armazenado em tubos *eppendorf* a -80°C para análise posterior.

As amostras de plasma foram utilizadas para determinação dos níveis de glicose, insulina, AGLs e glicagina. A concentração de glicose foi determinada por ensaio UV enzimático (método de hexoquinase) a 340 nm (autoanalisador *Olympus AU5400, Beckman Coulter®, Olympus, Hamburg, Germany*). A concentração de insulina foi determinada por eletroquimioluminescência (“ECLIA”), utilizando dois anticorpos monoclonais por *sandwich*. O autoanalisador utilizado foi o *Cobas® e411 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)*. A concentração de AGLs foi determinada por método colorimétrico a 550nm. O autoanalisador utilizado foi o *Olympus AU5400, Beckman Coulter® (Olympus, Hamburg, Germany)*. A concentração de glicagina foi determinada por RIA

(*Raioimmunoassay*) do tipo competitivo, sendo o autoanalisador utilizado o contador de radioatividade *Gamma Counter®* (*Euro Diagnostica AB, Malmö, Sweden*).

4.11. Desconforto gastrointestinal e percepção subjetiva de esforço

Para avaliar o DGI utilizou-se uma escala entre 0 pontos (completamente confortável) e 10 pontos (insuportável). A Escala de Borg (6 a 20 pontos) foi utilizada para avaliar a PSE. No final de cada patamar, os participantes classificaram o esforço e DGI sentidos durante a corrida (Figura 2).



Figura 2. Escalas para avaliação Percepção subjetiva de esforço (esquerda) e Desconforto gastrointestinal (direita).

4.12. Análise estatística

A análise estatística dos dados efetuou-se com recurso ao *IBM® SPSS® Statistics*, versão 25 para o Windows.

Os dados foram tratados com base nas estatísticas descritivas média e desvio padrão.

Para avaliar as diferenças foi utilizada ANOVA de duas vias de medidas repetidas (suplemento X intensidade) ou ANOVA de uma via de medidas repetidas (intensidade) quando apropriado, com teste de *Bonferroni* para as

múltiplas comparações. O teste não-paramétrico *Friedman* foi utilizado para DGI e PSE.

Dado que a amostra foi reduzida ($n=10$) os dados foram tratados em conjunto e o sexo foi considerado como co-variável.

O nível de significância utilizado foi de 5% ($p<0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação antropométrica

As características físicas dos participantes em estudo encontram-se na tabela 2. Verificou-se que os atletas são mais altos e mais pesados do que as atletas ($p<0,05$). Os atletas apresentaram menos massa gorda e mais massa magra do que as atletas ($p<0,05$).

Tabela 2. Características físicas dos participantes em estudo		
	Masculino (n=7)	Feminino (n=3)
Idade, anos	24,7±5,7	24,3±1,5
Altura, m	1,71±0,04*	1,64±0,04
Peso, kg	63,6±6,8*	54,4±3,1
IMC, kg·m ⁻²	21,8±1,9	20,3±0,2
Massa gorda, %	8,8±4,0*	19,2±3,4
Massa magra, kg	29,7±3,3*	21,6±1,6
Valores apresentados como média±desvio padrão; *vs. sexo feminino ($p<0,05$).		

5.2. Volume e intensidade de corrida

Na tabela 3 pode ser consultado o volume e intensidade de corrida realizado nos dois dias anteriores a cada teste. Conseguimos verificar que nos dois dias anteriores a cada momento de avaliação, as intensidades de corrida praticadas por cada participante foram semelhantes. E, quando comparadas à sua vVO_{2max} verificamos que estas foram de baixa a moderada intensidade.

Tabela 3. Volume e intensidade de corrida realizado nos dois dias anteriores a cada teste

Participante, Sexo	HC				HC+PRO				PLA			
	Dia 1		Dia 2		Dia 1		Dia 2		Dia 1		Dia 2	
	km	km/h	km	km/h	km	km/h	km	km/h	km	km/h	km	km/h
1, F	11,9	14,1	8,6	12,4	11,3	13,4	8,9	12,6	10,3	12,4	8,3	12,5
2, F	0,0	-	7,3	10,9	9,0	12,0	7,2	10,7	0,0	-	8,3	12,1
3, F	7,5	11,2	6,0	12,0	0,0	-	6,8	10,1	7,0	10,5	6,0	12,0
4, M	0,0	-	9,0	13,1	10,5	14,0	0,0	-	11,0	13,3	8,0	12,2
5, M	0,0	-	9,5	14,2	7,0	13,3	0,0	-	11,6	13,8	6,0	12,0
6, M	6,0	12,0	6,0	12,0	6,0	12,0	6,0	12,0	7,0	12,0	6,0	12,0
7, M	10,0	12,9	8,4	12,5	0,0	-	8,0	12,0	0,0	-	7,0	10,4
8, M	13,0	14,4	12,5	13,6	7,0	14,1	11,5	13,8	0,0	-	10,7	13,3
9, M	0,0	-	7,4	14,8	8,6	14,6	7,2	14,5	0,0	-	7,3	14,6
10, M	0,0	-	6,8	13,6	0,0	-	7,1	14,1	0,0	-	8,7	13,1

HC=hidratos de carbono; HC+PRO=hidratos de carbono mais proteína; PLA=placebo; F=Feminino; M=Masculino.

5.3. Ingestão energética e macronutrientes

Na tabela 4 podem ser consultadas as médias da ingestão energética (kcal) e de macronutrientes (HC, PRO e G), por cada participante, nos dois dias anteriores a cada teste. Verificamos que à exceção do participante número 2, todos os outros apresentaram ingestões diárias de HC condizentes com a literatura (Burke et al., 2011; Kerksick et al., 2017).

Tabela 4. Ingestão energética e macronutrientes

Participante, Sexo		Ingestão energética (kcal/dia)	HC (g/kg/d)	PRO (g/kg/d)	G (g/kg/d)	Suplementos
1, F	HC	2786±12	6,1±1,5	2,5±0,2	1,5±0,5	X
	HC+PRO	2396±125	5,2±0,5	2,2±0,0	1,3±0,4	X
	PLA	2620±391	5,1±0,4	2,9±0,7	1,5±0,7	X
2, F	HC	794±214	1,4±0,4	0,6±0,0	0,6±0,1	X
	HC+PRO	748±279	2,2±0,9	0,6±0,4	0,3±0,0	X
	PLA	891±164	1,5±0,3	0,8±0,5	0,7±0,0	X
3, F	HC	1944±706	7,9±6,2	1,6±0,7	2,0±1,0	Magnésio
	HC+PRO	1371±488	3,0±0,6	1,2±0,9	1,1±0,4	Magnésio
	PLA	1690±313	3,8±1,0	1,5±0,2	1,2±0,1	Magnésio
4, M	HC	1701±139	3,7±0,3	1,0±0,2	0,9±0,2	X
	HC+PRO	1377±471	3,3±0,7	1,1±0,6	0,5±0,3	X
	PLA	1729±524	3,8±1,1	1,5±0,1	0,7±0,5	X
5, M	HC	2479±663	6,0±1,9	1,9±0,1	1,5±0,5	X
	HC+PRO	3129±141	8,7±0,9	2,4±0,2	1,4±0,2	X
	PLA	1968±191	4,8±0,1	1,7±0,2	1,1±0,3	X
6, M	HC	1928±417	2,6±0,7	1,2±0,1	1,1±0,3	X
	HC+PRO	2584±408	3,5±0,2	1,6±0,5	1,5±0,3	X
	PLA	1882±523	3,0±0,5	1,2±0,5	0,8±0,3	X
7, M	HC	3068±303	5,5±1,1	2,1±0,2	1,2±0,1	X
	HC+PRO	2501±304	5,4±0,2	2,0±0,5	1,1±0,2	X
	PLA	2667±28	6,2±0,1	2,3±0,6	1,0±0,3	X
8, M	HC	3447±817	4,6±1,0	2,0±0,1	2,6±1,8	X
	HC+PRO	3405±544	5,2±0,8	2,3±0,4	2,2±0,7	X
	PLA	3389±1546	5,9±1,4	2,0±0,8	1,9±1,5	X
9, M	HC	3543±1269	8,7±3,2	2,1±0,2	1,6±0,9	X
	HC+PRO	2987±47	6,3±0,6	1,6±0,2	1,9±0,2	X
	PLA	3611±2026	6,7±2,2	2,7±1,3	2,4±2,1	X
10, M	HC	3211±266	6,6±1,1	1,8±0,1	2,0±0,0	X
	HC+PRO	3467±153	6,1±0,3	2,1±0,3	2,4±0,2	X
	PLA	2923±209	5,9±1,0	1,8±0,2	1,8±0,1	X

HC=hidratos de carbono; PRO=proteína; G=gordura; F Feminino; M=Masculino. Valores em média±desvio padrão; X = não tomou.

5.4. Peso pré- e pós-exercício e percentagem de variação do peso

Para o mesmo sexo, não se observaram diferenças ($p>0,05$) na percentagem de perda de peso com o exercício entre as condições (HC, HC+PRO e PLA). Verificou-se que os atletas do sexo feminino perderam menos peso do que os do sexo masculino, para todas as condições correspondentes às três bebidas (HC, HC+PRO e PLA) ($p<0,05$).

Tabela 5. Peso (kg) pré- e pós-exercício e perda de peso (%) respetiva

Participante, Sexo	HC			HC+PRO			PLA		
	Pré	Pós	%	Pré	Pós	%	Pré	Pós	%
1, F	57,8	57,4	0,7	57,4	56,9	0,9	58,4	58,1	0,5
2, F	55,2	54,8	0,7	53,5	53,3	0,4	55,5	55,1	0,7
3, F	51,2	50,8	0,8	50,7	50,4	0,6	50,9	50,6	0,6
(M±D.p.)	54,7±3,3	54,3±3,3	0,7±0,0	53,9±3,4	53,5±3,3	0,6±0,2	54,9±3,8	54,6±3,8	0,6±0,1
4, M	61,6	60,8	1,3	62,0	61,2	1,3	61,7	61,0	1,1
5, M	52,9	52,2	1,3	52,2	51,6	1,1	51,5	51,1	0,8
6, M	75,8	74,9	1,2	75,7	74,7	1,3	75,5	74,6	1,2
7, M	62,5	61,7	1,3	62,1	61,4	1,1	61,8	60,9	1,5
8, M	67,5	66,8	1,0	67,8	67,1	1,0	68,1	67,3	1,2
9, M	60,1	59,5	1,0	60,4	59,5	1,5	60,6	59,8	1,3
10, M	61,9	61,2	1,1	61,5	60,8	1,1	61,9	61,4	0,8
(M±D.p.)	63,2±7,0	62,4±7,0	1,2±0,1*	63,1±7,2	62,3±7,1	1,2±0,2*	63,0±7,4	62,3±7,2	1,1±0,3*

HC=hidratos de carbono; HC+PRO=hidratos de carbono mais proteína; PLA=placebo; F=Feminino; M=Masculino; M=média; D.p.=desvio padrão; n=10; *Estatisticamente diferente do sexo feminino ($p<0,05$).

5.5. Concentração de lactato

Na tabela 6, são apresentados os valores da $[La^-]$ em repouso e no final de cada patamar. Em repouso, a $[La^-]$ foi a mais baixa de entre todas as medições. Para todas as condições (bebidas), verificou-se uma diminuição da $[La^-]$ entre o patamar 1 e 2 e, a partir desse patamar, ocorreu um incremento progressivo da $[La^-]$.

Não se verificaram diferenças entre condições e, como expectável, os níveis de lactatemia foram significativamente superiores a partir do patamar 5 ($p<0,05$).

Tabela 6. Concentração de lactato

Condição	Patamar									
	Repouso	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Lactato (mmol/L)										
HC	1,2±0,4 ⁺	1,6±0,4 ⁺	1,4±0,3 ⁺	1,6±0,6 ⁺	2,4±1,6 ⁺	3,2±1,3 ^{#+}	4,6±1,5 ^{*#}	6,9±2,4 ^{*#}	9,7±3,6 ⁿ⁼⁹	9,1±0,4 ⁿ⁼²
HC+PRO	1,0±0,2 ^{*+}	1,6±0,4 ⁺	1,4±0,5 ⁺	1,7±0,6 ⁺	2,0±0,5 ⁺	2,8±0,8 ^{*#+}	5,8±3,0 [*]	7,9±2,7 ^{*#}	9,2±2,7 ⁿ⁼⁸	9,2±0,8 ⁿ⁼²
PLA	1,1±0,2 ⁺	1,7±0,7 ⁺	1,6±1,1 ⁺	1,8±0,9 ⁺	2,3±1,4 ⁺	3,3±2,2	5,0±2,9	7,5±3,4 ^{*#}	9,1±3,0 ⁿ⁼⁹	11,0±0,6 ⁿ⁼⁴

HC=hidratos de carbono; HC+PRO=hidratos de carbono mais proteína; PLA=placebo; Valores em média±desvio padrão; n=10 (salvo algumas exceções, as quais estão assinaladas M±D.p.^{n=x}); ^{*}vs. patamar 1 (p<0,05). [#]vs. patamar 3 (p<0,05). ⁺vs. patamar 7 (p<0,05).

5.6. Limiar anaeróbio

Na tabela 7, são apresentados os valores do LAn determinado para cada atleta nas três condições (HC, HC+PRO e PLA) e a velocidade correspondente. Não se verificaram diferenças entre condições neste parâmetro ($p>0,05$), ou seja, a adição de PRO não tem efeito no LAn.

Tabela 7. Limiar anaeróbio e velocidade correspondente

Participante, Sexo	HC		HC+PRO		PLA	
	LAn (mmol/L)	Vel. (km/h)	LAn (mmol/L)	Vel. (km/h)	LAn (mmol/L)	Vel. (km/h)
1, F	2,2	16,2	2,5	16,2	1,5	16,6
2, F	2,6	13,0	2,3	13,3	2,0	11,5
3, F	2,2	13,3	2,0	13,7	2,6	13,3
(M±D.p.)	2,3±0,2	14,2±1,8	2,3±0,3	14,4±1,6	2,0±0,6	13,8±2,6
4, M	2,0	15,5	1,7	16,6	2,0	15,1
5, M	1,8	16,9	2,3	17,3	2,2	15,8
6, M	2,5	16,2	3,2	17,6	3,2	17,6
7, M	2,0	16,2	2,0	16,6	2,0	16,6
8, M	2,0	17,3	2,1	17,6	2,0	17,3
9, M	2,1	17,3	2,3	16,9	2,3	15,8
10, M	3,2	15,8	3,5	15,5	4,1	14,8
(M±D.p.)	2,2±0,5	16,5±0,7	2,4±0,7	16,9±0,8	2,5±0,8	16,1±1,1

HC=hidratos de carbono; HC+PRO=hidratos de carbono mais proteína; PLA=placebo; F=Feminino; M=Masculino. LAn=Limiar anaeróbio em mmol/L; Vel.=Velocidade em km/h; M=média; D.p.=desvio padrão; n=10; *vs. sexo feminino ($p<0,05$).

5.7. Consumo máximo de oxigénio

Na tabela 8 são apresentados os valores de $VO_{2máx}$ alcançados por cada atleta nas três condições avaliadas. Não se verificaram diferenças entre condições neste parâmetro ($p>0,05$), ou seja, a adição de PRO não tem efeito no $VO_{2máx}$.

Tabela 8. Consumo máximo de oxigénio

Participante, Sexo	HC		HC+PRO		PLA	
	VO _{2máx} (ml/kg/min)	Vel (km/h)	VO _{2máx} (ml/kg/min)	Vel (km/h)	VO _{2máx} (ml/kg/min)	Vel (km/h)
1, F	62,8	18,3	63,8	18,3	61,3	18,3
2, F	49,5	15,0	45,4	14,0	49,5	15,0
3, F	52,0	15,4	54,9	16,4	53,0	15,4
(M±D.p.)	54,8±7,1	16,2±1,8	54,7±9,2	16,2±2,2	54,6±6,1	16,2±1,8
4, M	58,9	18,9	53,7	16,9	51,7	15,9
5, M	68,7	19,5	69,4	19,5	68,6	19,5
6, M	56,9	17,6	59,3	17,6	56,6	18,6
7, M	60,2	18,0	58,9	18,0	52,5	16,0
8, M	68,3	19,5	69,2	19,5	70,5	20,5
9, M	66,1	19,6	69,9	20,6	63,9	17,6
10, M	69,5	18,7	68,5	18,7	70,4	18,7
(M±D.p.)	64,1±5,3*	18,8±0,8	64,1±6,7*	18,7±1,3	62,0±8,3*	18,3±1,5

HC=hidratos de carbono; HC+PRO=hidratos de carbono mais proteína; PLA=placebo; F=Feminino; M=Masculino. VO_{2máx}=consumo máximo de oxigénio em ml/kg/min; Vel=velocidade em km/h; M=média; D.p.=desvio padrão; n=10; *vs. sexo feminino (p<0,05).

5.8. Perceção subjetiva de esforço, frequência cardíaca e desconforto gastrointestinal

A PSE incrementou, como esperado, com o aumento da intensidade da corrida, não se tendo contudo verificado diferenças significativas motivadas pela ingestão das diferentes bebidas (HC, HC+PRO e PLA) (tabela 9).

Relativamente à FC, não se verificaram diferenças entre as três condições, tendo, naturalmente, incrementado com a intensidade de exercício (p<0,05) (tabela 9).

No que diz respeito ao DGI, não se verificaram diferenças entre as três bebidas. Para todas as condições, verificou-se um ligeiro aumento do DGI entre os patamares 1 e 7, sem diferenças entre patamares para a mesma bebida.

Tabela 9. Percepção subjetiva de esforço, Frequência cardíaca e Desconforto gastrointestinal

Condição	Patamar								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Percepção subjetiva de esforço (Escala de Borg – 6 a 20 pontos)									
HC	7,0±1,2	8,5±1,5	10,0±2,2	11,5±1,7	13,8±1,3	15,8±1,4	18,0±1,1	19,0±0,9 ⁿ⁼⁹	19,5±0,7 ⁿ⁼²
HC+PRO	6,8±0,9	8,4±1,6	10,4±1,9	11,8±2,0	13,6±1,7	15,7±1,7	17,9±1,3	19,0±0,9 ⁿ⁼⁸	19,0±1,4 ⁿ⁼²
PLA	7,6±2,0	8,5±2,4	10,0±2,5	11,8±2,5	13,7±1,9	15,9±1,6	17,7±1,5	18,8±0,8 ⁿ⁼⁹	20,0±0,0 ⁿ⁼⁴
Frequência cardíaca (bpm)									
HC	142±7	152±7 ^{*#}	162±8 [*]	168±7 ^{*#}	176±8 ^{*#}	183±8 ^{*#}	189±7 ^{*#}	190±7 ⁿ⁼⁹	189±4 ⁿ⁼²
HC+PRO	124±29	154±6 ^{*#}	163±7 [*]	169±7 ^{*#}	177±7 ^{*#}	183±7 ^{*#}	190±7 ^{*#}	189±7 ⁿ⁼⁸	189±8 ⁿ⁼²
PLA	139±33	158±12 [*]	161±13	169±12 [#]	176±11 [#]	181±10 ^{*#}	184±16 ^{*#}	187±10 ⁿ⁼⁹	183±7 ⁿ⁼⁴
Desconforto gastrointestinal (Escala de 0 a 10)									
HC	0,7±0,8	1,0±1,2	1,6±1,3	1,9±1,4	2,1±1,9	2,7±2,5	3,2±3,0	2,3±2,5 ⁿ⁼⁹	2,5±3,5 ⁿ⁼²
HC+PRO	0,3±0,7	0,4±1,0	0,7±1,1	1,1±1,4	1,1±1,4	1,8±2,1	2,4±2,5	2,9±3,6 ⁿ⁼⁸	0,5±0,7 ⁿ⁼²
PLA	0,0±0,0	0,1±0,3	0,5±0,7	0,7±1,1	1,1±1,4	1,3±1,8	1,8±2,5	2,1±3,1 ⁿ⁼⁹	4,3±4,6 ⁿ⁼⁴

HC=hidratos de carbono; HC+PRO=hidratos de carbono mais proteína; PLA=placebo; bpm = batimentos por minuto ; Valores em média±desvio padrão; n=10 (salvo algumas exceções, as quais estão assinaladas M±D.p.^{n=x}). * vs. patamar 1 (p<0,05); # vs. patamar 3 (p<0,05).

5.9. Tempo até à exaustão

Todos os participantes realizaram os sete primeiros patamares (Tabela 10).

Na condição HC, nove participantes iniciaram o patamar 8, sendo que três conseguiram completá-lo (240 segundos) e apenas dois correram no patamar 9 durante 95 segundos. Na condição de HC+PRO, oito participantes entraram no patamar 8, tendo quatro conseguido completar esse patamar (240 segundos) e apenas dois entraram no patamar 9 (consequindo correr durante 65 segundos e 125 segundos). Na condição de PLA, nove participantes iniciaram no patamar 8, sendo que quatro conseguiram completá-lo (240 segundos). Dos nove participantes, quatro entraram no patamar seguinte. Na tabela 10 está registado o tempo que cada participante conseguiu correr nos patamares 8 e 9, bem como o tempo total que cada um conseguiu correr nos três testes.

No que diz respeito ao tempo até à exaustão, um indicador direto de *performance*, não se modificou em função da condição, ou seja, do tipo de bebida ingerida ($p>0,05$) (figura 3).

Tabela 10. Tempo de corrida nos patamares 8 e 9 e tempo total do teste experimental

Sujeito	Patamar 8			Patamar 9			Tempo total		
	HC	HC+PRO	PLA	HC	HC+PRO	PLA	HC	HC+PRO	PLA
1, F	140	170	115	-	-	-	1820	1850	1795
2, F	175	-	225	-	-	-	1855	1680	1905
3, F	155	-	130	-	-	-	1835	1680	1810
4, M	200	205	240	-	-	75	1880	1885	1995
5, M	135	105	-	-	-	-	1815	1785	1680
6, M	-	240	240	-	-	95	1680	1920	2015
7, M	240	240	240	95	-	100	2015	1920	2020
8, M	240	240	240	95	65	115	2015	1985	2035
9, M	240	240	185	-	125	-	1920	2045	1865
10, M	135	165	145	-	-	-	1815	1845	1825

HC=hidratos de carbono; HC+PRO=hidratos de carbono mais proteína; PLA=placebo; F=feminino; M=masculino; n=10. Nota: o tempo é apresentado em segundos e não foi contabilizado o intervalo entre patamares.

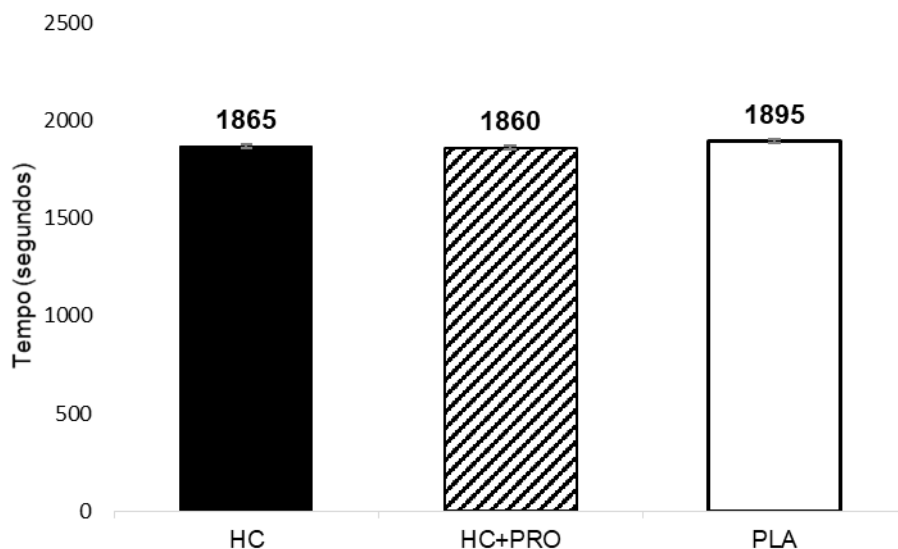


Figura 3. Duração do teste experimental. HC=hidratos de carbono; HC+PRO=hidratos de carbono e proteína; PLA=placebo. Valores apresentados em média, com desvio padrão representado pelas barras verticais; n=10. Nota: o tempo é apresentado em segundos e não foi contabilizado o intervalo entre patamares.

5.10. Quociente respiratório

A tabela 11 mostra os valores do QR de cada patamar para HC, HC+PRO e PLA. Não se verificaram diferenças entre bebidas ($p>0,05$). Do patamar 1 ao 7 verificou-se um aumento significativo do QR ($p<0,05$), como pode ser observado na figura 4.

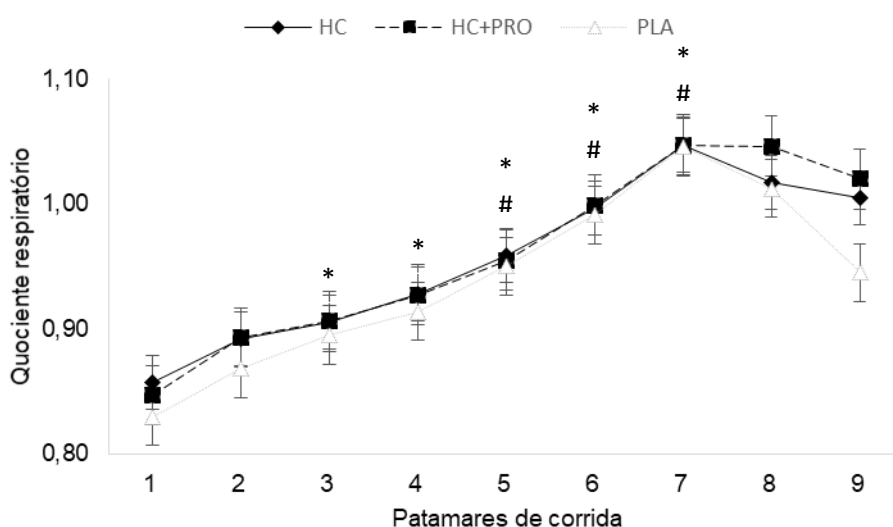


Figura 4. Quociente respiratório HC=hidratos de carbono; HC+PRO=hidratos de carbono e proteína; PLA=placebo. Valores apresentados em média±desvio padrão; n=10. *Estatisticamente diferente do patamar 1 ($p<0,05$); #Estatisticamente diferente do patamar 3 ($p<0,05$).

Tabela 11. Quociente respiratório									
Condição	Patamar								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	Quociente respiratório								
HC	0,86±0,04	0,89±0,04	0,91±0,04*	0,93±0,05*	0,96±0,06*#	1,00±0,05*#	1,05±0,06*#	1,02±0,08 ⁿ⁼⁹	1,01±0,02 ⁿ⁼²
HC+PRO	0,85±0,04	0,89±0,04	0,91±0,04*	0,93±0,05*	0,96±0,04*#	1,00±0,04*#	1,05±0,04*#	1,05±0,05 ⁿ⁼⁸	1,02±0,04 ⁿ⁼²
PLA	0,83±0,06	0,87±0,05	0,90±0,05*	0,91±0,05*	0,95±0,05*#	0,99±0,04*#	1,05±0,04*#	1,01±0,07 ⁿ⁼⁹	0,95±0,05 ⁿ⁼⁴
HC=hidratos de carbono; HC+PRO=hidratos de carbono mais proteína; PLA=placebo; Valores em média±desvio padrão; n=10. * vs. patamar 1 (p<0,05); # vs. patamar 3 (p<0,05).									

5.11. Glicose, insulina, ácidos gordos livres e glicagina

Glicose

Não se verificaram diferenças na glicemia entre condições no momento basal (antes da ingestão da bebida – Jejum) ($p>0,05$). Contudo, 30 minutos após a ingestão da bebida e após o patamar 7 observaram-se diferenças significativas entre PLA e as outras bebidas ($p<0,05$).

Para os momentos de recolha, verificaram-se diferenças entre o momento de jejum vs. 30 minutos após a ingestão e patamar 7; 30 minutos após a ingestão vs. patamar 3; patamar 3 vs. patamar 7.

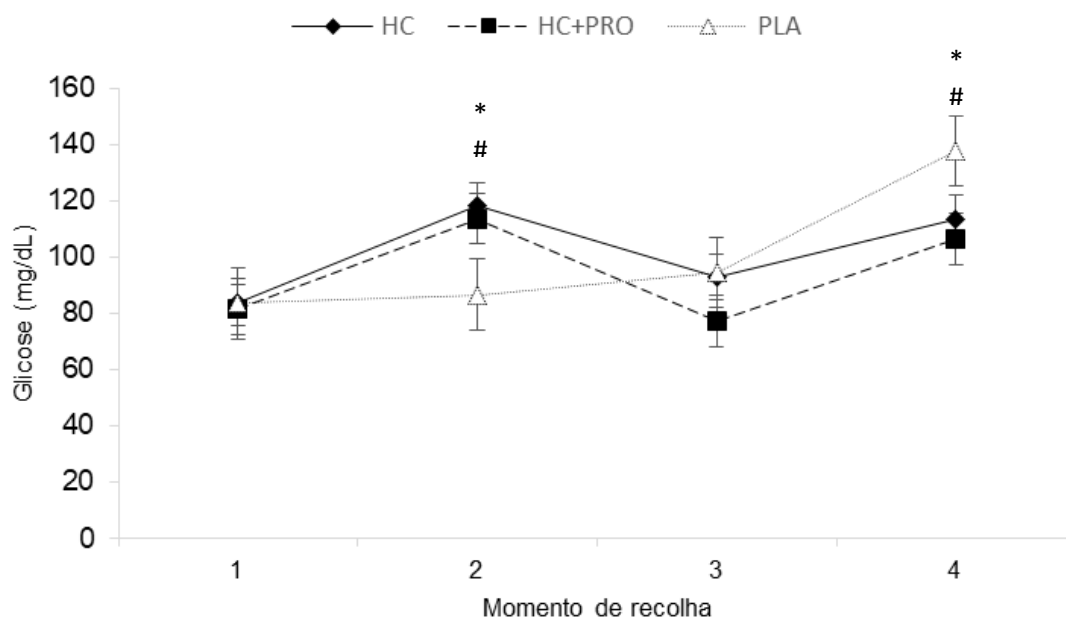


Figura 5. Concentração de glicose em jejum (recolha 1), 30 minutos após a ingestão (recolha 2), após os patamares 3 (recolha 3) e 7 (recolha 4). Os participantes foram avaliados em três condições: hidratos de carbono – 1,0g/kg (HC); hidratos de carbono e proteína – 0,75g/kg + 0,25g/kg (HC+PRO) e placebo (PLA). Valores apresentados em média, com desvio padrão representado pelas barras verticais; n=10. * $p<0,05$, PLA vs. HC; # $p<0,05$ PLA vs. HC+PRO.

Tabela 12. Concentração de glicose (mg/dL)

Condição	Recolhas			
	1 (Jejum)	2 (30 min. após ingestão)	3 (Patamar 3)	4 (Patamar 7)
HC	83,9±5,1	118,3±36,5 ⁺	92,8±30,3	113,6±26,5 ⁺
HC+PRO	81,3±5,0	113,7±21,6 ⁺	77,2±22,4	106,5±21,3 ⁺
PLA	83,6±7,2	86,7±8,4	94,6±11,7	137,8±28,4

HC=hidratos de carbono; HC+PRO=hidratos de carbono e proteína; PLA=placebo. Valores apresentados em média±desvio padrão; n=10. ⁺ $p<0,05$ vs. PLA.

Insulina

Não se verificaram diferenças entre condições no momento basal (antes da ingestão da bebida – Jejum) ($p>0,05$). Contudo, 30 minutos após a ingestão, observaram-se diferenças entre a condição PLA e as outras ($p<0,05$). Importa referir que as diferenças no patamar 3 entre HC vs. PLA quase alcançaram significado estatístico ($p=0,087$).

Para os momentos de recolha verificaram-se diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$) entre o momento de jejum vs. 30 minutos após a ingestão do suplemento; 30 minutos após a ingestão do suplemento vs. patamar 3 e patamar 7.

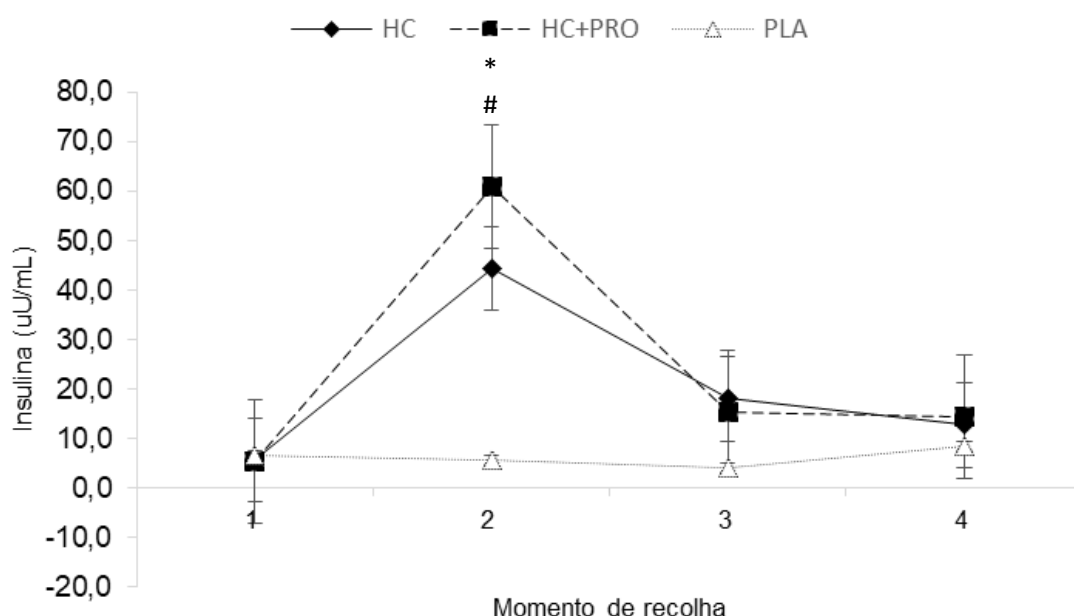


Figura 6. Concentração de insulina em jejum (recolha 1), 30 minutos após a ingestão (recolha 2), após os patamares 3 (recolha 3) e 7 (recolha 4). Os participantes foram avaliados em três condições: hidratos de carbono – 1,0g/kg (HC); hidratos de carbono e proteína – 0,75g/kg + 0,25g/kg (HC+PRO) e placebo (PLA). Valores apresentados em média, com desvio padrão representado pelas barras verticais; n=10. * $p<0,05$, PLA vs. HC; # $p<0,05$ PLA vs. HC+PRO.

Tabela 13. Concentração de insulina (uU/mL)

Condição	Recolhas			
	1 (Jejum)	2 (30 min. após ingestão)	3 (Patamar 3)	4 (Patamar 7)
HC	5,6±2,4	44,5±29,3 ⁺	18,0±23,4	12,7±10,8
HC+PRO	5,3±2,9	60,8±44,5 ⁺	15,3±11,5	14,4±15,1
PLA	6,6±3,2	5,5±2,2	4,2±2,1	8,5±7,4

HC=hidratos de carbono; HC+PRO=hidratos de carbono e proteína; PLA=placebo. Valores apresentados em média±desvio padrão; n=10. + $p<0,05$ vs. PLA.

Ácidos gordos livres

Não se verificaram diferenças entre condições no momento basal (antes da ingestão da bebida – Jejum) ($p>0,05$). Contudo, elas manifestam-se 30 minutos após a ingestão HC vs. PLA e HC+PRO vs. PLA, bem como no final do patamar 3 entre HC vs. PLA e HC+PRO vs. PLA ($p<0,05$).

Foram observadas diferenças ($p<0,05$) entre os momentos de jejum vs. 30 minutos após; 30 minutos após vs. patamar 3 e patamar 7; patamar 3 vs. patamar 7.

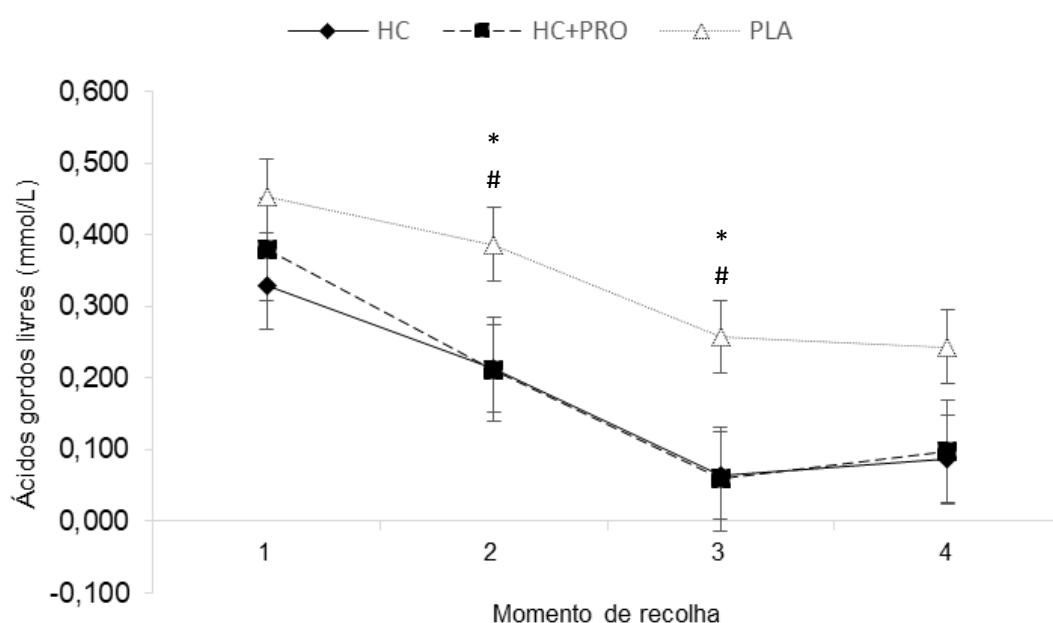


Figura 7. Concentração de ácidos gordos livres em jejum (recolha 1), 30 minutos após a ingestão (recolha 2), após os patamares 3 (recolha 3) e 7 (recolha 4). Os participantes foram avaliados em três condições: hidratos de carbono – 1,0g/kg (HC); hidratos de carbono e proteína – 0,75g/kg + 0,25g/kg (HC+PRO) e placebo (PLA). Valores apresentados em média, com desvio padrão representado pelas barras verticais; n=10. * $p<0,05$, PLA vs. HC; # $p<0,05$ PLA vs. HC+PRO.

Tabela 14. Concentração de ácidos gordos livres (mmol/L)				
Condição	Recolhas			
	1 (Jejum)	2 (30 min. após ingestão)	3 (Patamar 3)	4 (Patamar 7)
HC	0,328±0,271	0,213±0,123 ⁺	0,065±0,038 ⁺	0,087±0,063
HC+PRO	0,379±0,157	0,212±0,141 ⁺	0,059±0,021 ⁺	0,097±0,062
PLA	0,454±0,411	0,387±0,248	0,258±0,171	0,244±0,187

HC=hidratos de carbono; HC+PRO=hidratos de carbono e proteína; PLA=placebo. Valores apresentados em média±desvio padrão; n=10. + $p<0,05$ vs. PLA.

Glicagina

Verificaram-se diferenças entre condições ($p<0,05$) no momento basal (antes da ingestão da bebida – Jejum) (HC vs. HC+PRO e PLA vs. HC+PRO), bem como 30 minutos após HC vs. HC+PRO e HC+PRO vs. PLA (figura 8). No entanto, não era expectável haver diferenças no momento basal e por isso decidimos avaliar os incrementos percentuais para cada bebida (figura 9). Verifica-se que em todas as bebidas há um aumento da glicagina ao longo do exercício e que o maior valor ocorre no final do patamar 7 (Tabela 16), com diferenças estatísticas ($p<0,05$) entre a bebida HC+PRO vs. PLA e no final do patamar 3 entre as mesmas bebidas (HC+PRO vs. PLA). Nos momentos de recolha verificaram-se diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$) no momento de jejum vs. patamar 7; 30 minutos após a ingestão do suplemento vs. patamar 7; patamar 3 vs. patamar 7.

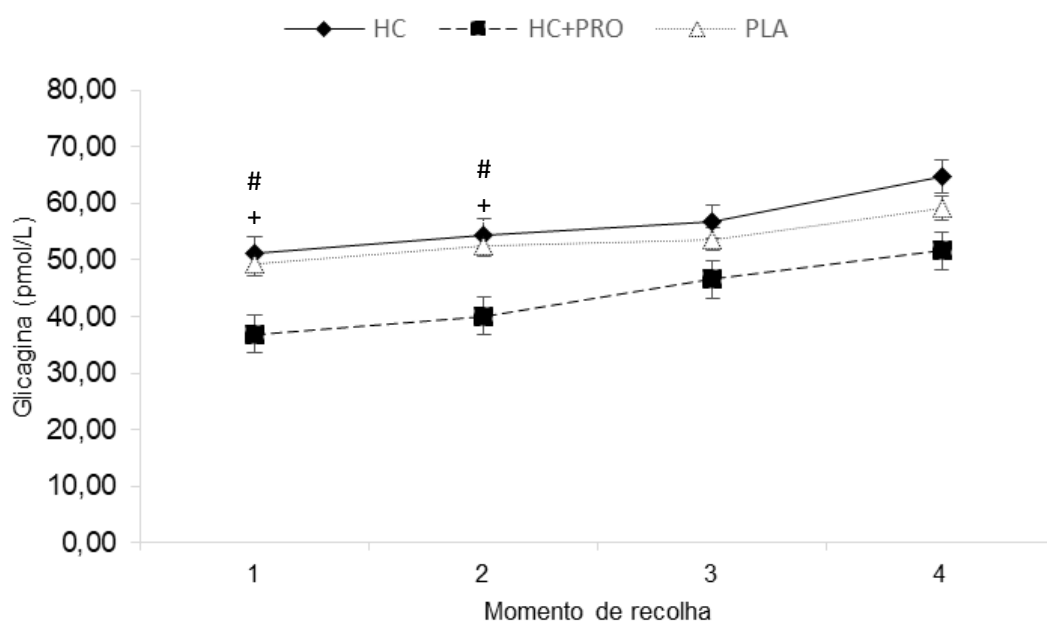


Figura 8. Concentração de glicagina em jejum (recolha 1), 30 minutos após a ingestão (recolha 2), após os patamares 3 (recolha 3) e 7 (recolha 4). Os participantes foram avaliados em três condições: hidratos de carbono – 1,0g/kg (HC); hidratos de carbono e proteína – 0,75g/kg + 0,25g/kg (HC+PRO) e placebo (PLA). Valores apresentados em média, com desvio padrão representado pelas barras verticais; n=10. # $p<0,05$ PLA vs. HC+PRO; + $p<0,05$ HC vs. HC+PRO.

Tabela 15. Concentração de glicagina (pmol/L)				
Condição	Recolhas			
	1 (Jejum)	2 (30 min. após ingestão)	3 (Patamar 3)	4 (Patamar 7)
HC	51,21±10,90 ⁺	54,33±10,64 ⁺	56,75±10,93	64,69±12,73
HC+PRO	36,89±5,87 ⁺	40,05±6,34 ⁺	46,62±13,23	51,58±11,98
PLA	49,35±7,82	52,59±10,07	53,65±11,35	59,21±12,49

HC=hidratos de carbono; HC+PRO=hidratos de carbono e proteína; PLA=placebo. Valores apresentados em média±desvio padrão; n=10. ⁺ p<0,05 vs. PLA.

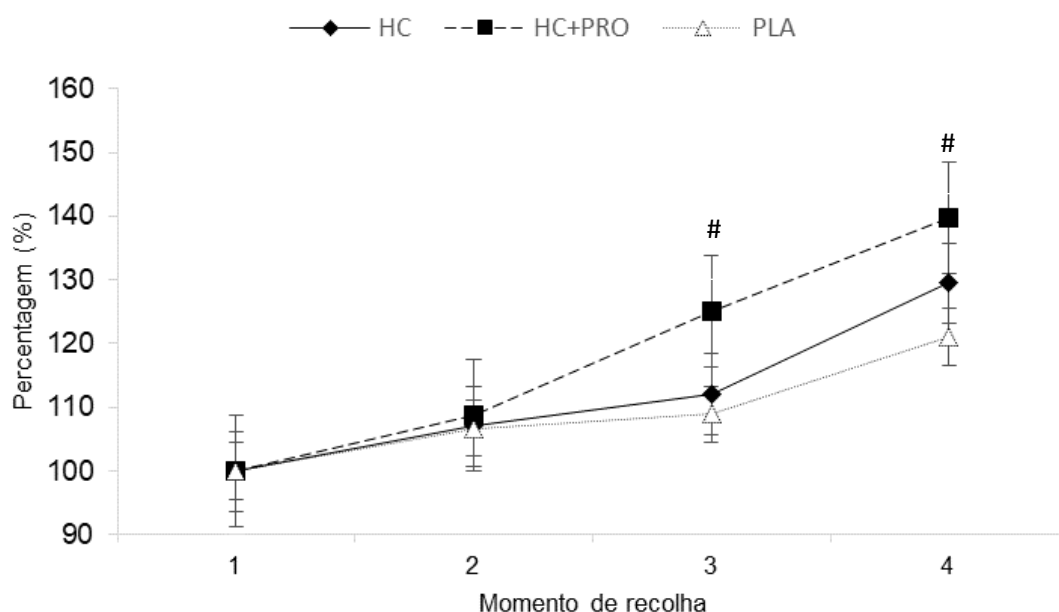


Figura 9. Incremento percentual de glicagina

Jejum (recolha 1), 30 minutos após a ingestão (recolha 2), após os patamares 3 (recolha 3) e 7 (recolha 4). Os participantes foram avaliados em três condições: hidratos de carbono – 1,0g/kg (HC); hidratos de carbono e proteína – 0,75g/kg + 0,25g/kg (HC+PRO) e placebo (PLA). n=10. # p<0,05 PLA vs. HC+PRO.

Tabela 16. Comportamento da glicagina ao longo do exercício (%)				
Condição	Recolhas			
	1 (Jejum)	2 (30 min. após ingestão)	3 (Patamar 3)	4 (Patamar 7)
HC	100±21	107±11	112±13	129±31
HC+PRO	100±16	109±7	125±21 ⁺	140±21 ⁺
PLA	100±16	107±11	109±15	121±22

HC=hidratos de carbono; HC+PRO=hidratos de carbono e proteína; PLA=placebo. Valores percentuais apresentados em média±desvio padrão; n=10. * p<0,05, vs. HC; # p<0,05 vs. HC+PRO; + p<0,05 vs. PLA. Nota: os momentos de recolha 2, 3 e 4 são expressados como as médias da percentagem respeitante aos valores em jejum de cada atleta.

6. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Até ao momento, a maioria dos estudos centrou-se na análise da influência da ingestão de HC+PRO durante o exercício ou no período de recuperação (Ormsbee et al., 2014), sendo inexistentes os centrados na influência desta combinação (HC+PRO vs. HC apenas) ingerida antes do exercício. Assim sendo, o presente trabalho pretendeu estudar se a sua ingestão antes do exercício influencia de forma distinta alguns parâmetros fisiológicos, biomarcadores sanguíneos e de *performance* em atletas de atletismo da disciplina de meio-fundo, durante um exercício de intensidade progressiva até à exaustão. Com a sua realização verificamos que a adição de PRO não teve influência nos parâmetros fisiológicos ($VO_{2máx}$, LAn, QR, FC), na [La-], no DGI e na PSE. Verificou-se também que o tempo até à exaustão foi superior na condição de PLA>HC>HC+PRO embora sem significado estatístico (1895, 1865 e 1860 segundos, respetivamente) e que os biomarcadores analisados (glicose, insulina, AGLs e glicagina) não se apresentaram diferentes entre as condições.

Os resultados do presente trabalho mostram que, em qualquer das condições (HC, HC+PRO e PLA), os participantes do sexo feminino perderam menos peso durante o exercício do que os do sexo masculino ($p<0,05$). A perda de peso durante o exercício reflete, sobretudo, a perda de água, particularmente por mecanismos de sudação e evaporação, decisivos na regulação da temperatura corporal nesta condição de exercício. A literatura reporta que a taxa de suor varia consoante o ambiente (temperatura, humidade e vento), o sexo, o tamanho corporal e a intensidade e duração do exercício (Travis et al., 2016). O sexo feminino apresenta menores taxas de suor e menores perdas de eletrólitos do que o sexo masculino (Medicine et al., 2007). Tais diferenças parecem dever-se ao índice de massa corporal (IMC) mais baixo e taxas metabólicas mais baixas durante o exercício (Medicine et al., 2007). Manter um estado de hidratação adequado é fundamental para manter a temperatura corporal e otimizar a *performance*. A desidratação pode aumentar a perceção do esforço e influenciar o rendimento desportivo (Travis et al., 2016). Exercícios aeróbios realizados em ambientes quentes indutores de perdas superiores a 2% do peso corporal podem comprometer a função cognitiva e a *performance* do atleta (Shirreffs & Sawka,

2011; Travis et al., 2016). Para exercícios anaeróbios ou de elevada intensidade e exercícios aeróbios realizados em ambientes frescos, a diminuição da *performance* pode ocorrer quando as taxas de suor são da ordem dos 3 a 5% (Travis et al., 2016). No presente trabalho, as taxas de suor encontram-se compreendidas entre 0,6 e 1,2%, podendo sugerir que esta perda não influenciou o desempenho dos participantes. Verificou-se também que a presença de HC e de HC+PRO nas bebidas não influenciaram a perda de peso ($p>0,05$). Desta forma, podemos referir que a adição de PRO não influencia o nível de desidratação.

A produção de La^- durante o exercício depende, entre outros fatores, da duração e intensidade do exercício, bem como da quantidade de massa muscular envolvida (Powers & Howley, 2004). O nível atlético também influencia; para indivíduos não treinados o aumento da $[\text{La}^-]$ ocorre a 60-65% do $\text{VO}_{2\text{máx}}$ e para atletas de endurance ocorre a 80-90% do $\text{VO}_{2\text{máx}}$ (Hawley et al., 2018). Durante o exercício, a $[\text{La}^-]$ e $[\text{H}^+]$ podem aumentar para valores muito elevados, comprometendo a função muscular (Gladden, 2004). Qualquer efeito prejudicial do ácido láctico ($\text{ácido láctico} = \text{La}^- + \text{H}^+$) na *performance* é devido ao H^+ e não ao La^- (Gladden, 2004). Contudo, através da medição da $[\text{La}^-]$ conseguimos perceber que o seu aumento reflete o aumento da $[\text{H}^+]$. Os resultados do presente estudo mostram que, para todas as bebidas (HC, HC+PRO e PLA), a $[\text{La}^-]$ em repouso foi, obviamente, a mais baixa de entre todas as medições. Com o início da corrida (patamar 1) a $[\text{La}^-]$ aumentou ligeiramente e, entre os patamares 1 e 2, verificou-se uma diminuição da sua concentração, embora sem significado estatístico ($p>0,05$). Para melhor compreender esta observação, é importante referir que adicionalmente ao que é classicamente assumido, o La^- é uma importante fonte de energia e o principal precursor da gliconeogénese (Brooks, 2018). Os termos “*cell-cell*” e “*intracelular lactate shuttle*” descrevem a importância do La^- como substrato oxidativo e para a gliconeogénese, bem como na sinalização celular (Brooks, 2018). Exemplos de “*cell-cell*” são: a interação entre as fibras glicolíticas e as fibras oxidativas e a interação entre o músculo-esquelético e o coração, cérebro, fígado e rins; de “*intracelular lactate shuttle*” temos: as trocas entre o citosol e a mitocôndria e entre o citosol e o peroxissoma

(Brooks, 2018). Assim, a diminuição da $[La^-]$ no início do exercício (entre os patamares 1 e 2) pode dever-se a estas interações, que levam à remoção do La^- a uma taxa superior à sua produção, pois nestes patamares a intensidade do exercício é muito baixa, ativando, do ponto de vista metabólico e de forma não muito intensa, as fibras musculares oxidativas. A partir do patamar 2 verificou-se um aumento progressivo da $[La^-]$ que se deve ao aumento da intensidade de corrida (Baldari & Guidetti, 2000). Nos patamares 6 e 7 os valores foram significativamente superiores aos registados no patamar 1 ($p < 0,05$), sendo esta diferença expectável pois a velocidade de corrida nestes patamares é bastante superior. Dos atletas que tiveram capacidade para correr no patamar 8, também se verificou um aumento da $[La^-]$ com todas as bebidas (HC, HC+PRO e PLA). As principais causas do aumento da $[La^-]$ com a intensidade do exercício são: (1) aumento da glicólise; (2) diminuição da pressão de O_2 intramuscular que leva ao aumento da relação $[ADP][Pi]/[ATP]$, estimulando assim a glicólise e por conseguinte aumentando a produção de La^- , (3) menor taxa de remoção de La^- , (4) recrutamento das fibras de contração rápida, as quais apresentam uma maior capacidade de produção de La^- (Gladden, 2004). Importante no contexto do presente trabalho foi que a adição de PRO não influenciou a $[La^-]$ para qualquer intensidade de corrida avaliada. Sabemos que no estado pós-absortivo o La^- é um precursor da gliconeogénese, contribuindo, desta forma, para regular a glicemia. Por outro lado, após a ingestão e digestão de HC, ocorre a glicólise e produção de La^- em tecidos periféricos (músculos, por exemplo) (Brooks, 2018). Desta forma, e dado que no presente trabalho se verificou uma maior concentração de glicose sanguínea com a ingestão de HC (Figura 5, Tabela 12), comparativamente com a ingestão de HC+PRO, seria de esperar que a $[La^-]$ fosse superior com a ingestão de HC apenas. Tal só se verificou nos patamares 4, 5, 8 e 9, mas sem diferenças significativas ($p > 0,05$).

O $VO_{2máx}$ é definido como a taxa máxima na qual o O_2 pode ser captado e utilizado durante um exercício de alta intensidade (Bassett et al., 2000). No presente trabalho, a adição de PRO não teve qualquer efeito no $VO_{2máx}$ ($p > 0,05$), facto que era imaginável considerando os fatores fisiológicos que o influenciam (Bassett et al., 2000): 1) capacidade de difusão pulmonar, 2) débito cardíaco

máximo, 3) capacidade de transporte de O₂ no sangue e 4) características do músculo-esquelético.

Os parâmetros PSE, a FC e o DGI não foram influenciados pela bebida ingerida antes do exercício, sendo que a PSE e a FC aumentaram, naturalmente, com a intensidade de corrida em todas as condições, atingindo valores superiores nos patamares finais. No que diz respeito ao DGI, verificamos um ligeiro incremento ao longo do exercício. Os valores reportados foram ligeiramente superiores para HC>HC+PRO>PLA, embora sem significado estatístico ($p>0,05$). Esperávamos que a adição de PRO causa-se maior DGI do que a ingestão de HC apenas, uma vez que segundo a literatura a presença de PRO tem sido associada a um maior risco de desenvolver sintomas gastrointestinais (Oliveira et al., 2014).

A adição de PRO (0,25g/kg) a HC (0,75g/kg) na bebida não melhorou a performance quando comparada com a ingestão de bebida composta apenas por HC (1,0g/kg) e PLA. Como referido, a intensidade de cada patamar teve como referência a velocidade de corrida aos 3000m (patamar 7), sendo esta uma distância de competição corrida a uma intensidade de aproximadamente 98% do VO_{2máx} (Billat, 2002). Assim, foi possível analisar o efeito do consumo de HC+PRO antes do exercício em diferentes intensidades de esforço, permitindo, assim, contribuir para melhor compreender a influência destas diferentes condições em diferentes intensidades de exercício, das mais baixas para as mais elevadas, incluindo as próximas do esforço realizado em competição. A literatura reporta que uma maratona pode ser corrida a aproximadamente 75-85% VO_{2máx}, uma corrida de 10km entre 90-100% VO_{2máx} e os 5km podem ser corridos perto do VO_{2máx} (Joyner & Coyle, 2008). Assim, e dado que no patamar 7 os atletas correram à velocidade dos 3000m, seria de esperar que o tempo até à exaustão não fosse diferente. Importa, ainda, referir que o protocolo de exercício considerado no sentido de contemplar diversas intensidades de corrida teve uma duração bastante inferior a 1 hora (~31 minutos), sendo que as recomendações pré-exercício apenas estão direcionadas para exercícios de duração superior a 1 hora (1-4g/kg ingeridos 1-4h antes) (Burke et al., 2011). Possivelmente, para esforços de duração inferior a 1 hora, a alimentação pré-exercício poderá ter um

efeito positivo na capacidade de recuperação pós exercício que, caso os atletas realizassem um segundo exercício, se poderia refletir numa melhor *performance* como evidenciado em alguns estudos (Berardi et al., 2008; Betts et al., 2007; Niles et al., 2001; Williams et al., 2003), mas não ter impacto no primeiro exercício pela sua reduzida duração. Por outro lado, bochechar com uma bebida com HC (sem engolir) cerca de 4 a 12 vezes durante 5 a 10 segundos poderia melhorar a *performance* em exercícios de duração inferior a 1 hora (Burke et al., 2011; Carter et al., 2004; Chambers et al., 2009; Jeukendrup & Chambers, 2010; Oliveira & Burini, 2014; Silva et al., 2014), em vez da sua ingestão 30 minutos antes do exercício.

Um outro indicador metabólico analisado decorrente da análise das frações gasosas do ar expirado ao longo do exercício foi o QR. O QR (CO_2 produzido/ O_2 consumido) estima a contribuição dos HC e gorduras para produção de energia durante o exercício, apresentando valores teóricos que variam de 0,7 (oxidação exclusiva de gorduras) a 1 (oxidação exclusiva de HC) (Powers & Howley, 2004). Uma das hipóteses iniciais do nosso trabalho foi que a adição de PRO a uma bebida composta por HC poderia, via disponibilização potencialmente mais lenta dos HC devido ao esvaziamento gástrico mais lento, traduzir-se em valores inferiores do QR, particularmente para intensidades de exercício submáximas. Por outro lado, a presença de PRO poderia conduzir ao aumento da concentração de glicagina no sangue, estimulando a produção de glicose pelo fígado a qual poderia ser utilizada pelo músculo. Contudo, não se verificaram diferenças significativas entre bebidas ($p>0,05$), ou seja, a adição de PRO não influenciou o QR. E, a ausência de diferenças entre a condição de PLA e as outras condições (HC+PRO e HC) poderá ser explicada pelo glicogénio muscular ser suficiente para suportar energeticamente o exercício. Como esperado, verificamos que o QR aumentou com a intensidade da corrida, observando-se diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$) no patamar 7 vs. patamares 1 e 3 para todas as bebidas (HC, HC+PRO e PLA).

Analisámos, igualmente, alguns indicadores bioquímicos plasmáticos, nomeadamente as concentrações de glicose, insulina, AGLs e glicagina, os

quais estão particularmente associados ao metabolismo energético. Efetivamente, a insulina e a glicagina são hormonas pancreáticas que regulam o metabolismo da glicólise e, conseqüentemente, também dos ácidos gordos. Por exemplo, quando a razão glicagina/insulina aumenta ocorre uma estimulação da gliconeogénese e glicogenólise hepática com conseqüências na disponibilidade de glicose (Frayn, 2012). Observámos que no momento de repouso, após a ingestão de HC e HC+PRO, verificou-se um aumento da concentração de glicose sanguínea, sendo este inferior com a ingestão de HC+PRO. Esta observação pode dever-se à menor quantidade de HC ingerida, ao possível esvaziamento gástrico mais lento motivado pela presença de PRO (Toone & Betts, 2010) e ao facto da ingestão de PRO levar a uma maior libertação de insulina, que por sua vez aumenta a taxa de captação de glicose pelos músculos via translocação de GLUT4 (transportador de glicose sensível à insulina) (Frayn, 2012). Com o início do exercício verifica-se uma diminuição da concentração de glicose e, após o patamar 3 ocorre um ligeiro aumento. Estas alterações na glicemia ao longo do exercício também se verificaram noutros estudos, embora o *timing* de ingestão tenha sido diferente – 15 minutos antes do exercício (Tokmakidis & Karamanolis, 2008; Toone & Betts, 2010). Na condição de PLA, a concentração de glicose aumentou ao longo do exercício, verificando-se um maior incremento entre o patamar 3 e 7. Com o aumento da intensidade do exercício verifica-se um aumento da libertação de cortisol (ação lenta) e adrenalina (ação rápida), levando à libertação de glicose e diminuição da sua captação (Powers & Howley, 2004).

Com a ingestão de PRO verificou-se uma maior libertação de insulina comparativamente com a ingestão de HC apenas. O aumento da concentração de aminoácidos no sangue, decorrente da ingestão de PRO, é responsável pela estimulação das células β do pâncreas, levando à libertação de insulina (Calbet & MacLean, 2002; Loon, Saris, Verhagen, et al., 2000). Com o exercício, ocorreu uma diminuição da concentração de insulina, sendo esta mais acentuada no início. Durante o exercício, a diminuição da concentração de insulina evita a captação de glicose pelos tecidos a uma velocidade elevada, evitando assim o aparecimento de hipoglicemia (Powers & Howley, 2004). Esta variação da

insulina favorece a libertação de glicose pelo fígado, bem como a libertação de AGLs pelo tecido adiposo (Powers & Howley, 2004). No nosso estudo verificou-se um ligeiro incremento da concentração de AGLs entre o patamar 3 e o patamar 4. Na condição de jejum (PLA), a concentração plasmática de AGLs diminuiu ao longo do exercício, facto que pode ocorrer devido a: 1) aumento da $[La^-]$ e 2) diminuição do fluxo sanguíneo para o tecido adiposo (Powers & Howley, 2004).

No que diz respeito à glicagina, não conseguimos perceber porque motivo no momento basal (jejum) se verificaram diferenças significativas entre as condições PLA vs. HC vs. HC+PRO. Por este facto, decidimos analisar os incrementos percentuais (Figura 9 e Tabela 16). Ao longo do exercício, verificamos que com a ingestão de PRO ocorreu um aumento superior da concentração sanguínea de glicagina comparativamente com a ingestão de HC apenas e PLA, sendo este significativo no final dos patamares 3 e 7 entre PLA vs. HC+PRO ($p<0,05$). Este aumento poderá ter ocorrido devido à maior concentração de aminoácidos no sangue após a ingestão de PRO, os quais estimulam as células α do pâncreas a libertar glicagina (Calbet & MacLean, 2002; Frayn, 2012). A glicagina estimula a glicogenólise e a gliconeogénese hepática, levando ao aumento da concentração sanguínea de glicose (Frayn, 2012; Hayashi & Seino, 2018).

Com a realização deste trabalho podemos concluir que a adição de PRO (0,25g/kg) a uma menor quantidade de HC (0,75g/kg), ingerida 30 minutos antes de um exercício de intensidade incremental, não se traduziu em alterações na *performance*, assim como em indicadores fisiológicos e bioquímicos associados ao metabolismo, quando comparada com a ingestão de HC apenas (1,0g/kg). Possivelmente, a curta duração do exercício poderá explicar a ausência de efeito. E, provavelmente, a disponibilidade de glicose sanguínea foi suficiente para fornecer energia durante o exercício, não comprometendo assim a *performance*, nem influenciando qualquer dos outros indicadores analisados (Tsintzas & Williams, 1998). Como podemos verificar, no estudo de Tokmakidis e Karamanolis, de duração superior a 1 hora, a ingestão de glicose (1,0g/kg) 15 minutos antes de um exercício (5min a 60% + 45min a 70% + 80% $VO_{2máx}$ até à

exaustão) constituiu uma fonte de energia exógena que se refletiu numa melhoria da *performance* (Glicose $83,0 \pm 4,4$ vs. Placebo $73,6 \pm 5,2$ minutos) (Tokmakidis & Karamanolis, 2008). Por outro lado, a adição de PRO também não comprometeu nenhum parâmetro pelo que pode ser útil para disponibilizar aminoácidos no período pós-exercício para uma recuperação mais eficaz, particularmente quando não é possível fazer uma ingestão imediatamente após o seu término.

7. SUGESTÕES PARA INVESTIGAÇÕES FUTURAS

A literatura carece de estudos que avaliem o efeito que a ingestão de HC+PRO antes do exercício tem na *performance* do atleta, bem como num conjunto de indicadores que, direta ou indiretamente, poderão associar-se ao metabolismo nestas prestações. Neste sentido, poderia ser interessante estudar o efeito deste tipo de manipulações dietéticas em exercícios do tipo *Time Trial* de duração superior a 1 hora, de forma a simular o ambiente competitivo e, ainda, pelo facto de em esforços desta duração ser recomendada a ingestão de HC (Burke et al., 2011; Jeukendrup, 2008).

8. BIBLIOGRAFIA

- Abdulla, H., Smith, K., Atherton, P. J., & Idris, I. (2016). Role of insulin in the regulation of human skeletal muscle protein synthesis and breakdown: a systematic review and meta-analysis. *Diabetologia*, 59, 44-55.
- Adamo, K. B., Tarnopolsky, M. A., & Graham, T. E. (1998). Dietary carbohydrate and postexercise synthesis of proglycogen and macroglycogen in human skeletal muscle. *The American Journal of Physiology*, 275(2 Pt 1), E229-234.
- Alghannam, A. F., Gonzalez, J. T., & Betts, J. A. (2018). Restoration of Muscle Glycogen and Functional Capacity: Role of Post-Exercise Carbohydrate and Protein Co-Ingestion. *Nutrients*, 10(2), E253.
- Amy L. Heck, Cristina S. Barroso, Margaret E. Callie, & Bray, M. S. (2004). Gene–Nutrition Interaction in Human Performance and Exercise Response. *Nutrition*, 20(7-8), 598-602.
- Baldari, C., & Guidetti, L. (2000). A simple method for individual anaerobic threshold as predictor of max lactate steady state. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 32(10), 1798-1802.
- Bassett, D. R., JR., & Howley, E. T. (2000). Limiting factors for maximum oxygen uptake and determinants of endurance performance. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 32(1), 70-84.
- Berardi, J. M., Noreen, E. E., & Lemon, P. W. (2008). Recovery from a cycling time trial is enhanced with carbohydrate-protein supplementation vs. isoenergetic carbohydrate supplementation. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 5(24).
- Berardi, J. M., Price, T. B., Noreen, E. E., & Lemon, P. W. R. (2006). Postexercise muscle glycogen recovery enhanced with a carbohydrate-protein supplement. *Medicine and science in sports and exercise*, 38(6), 1106-1113.
- Betts, J., Williams, C., Duffy, K., & Gunner, F. (2007). The influence of carbohydrate and protein ingestion during recovery from prolonged exercise on subsequent endurance performance. *Journal of Sports Sciences*, 25(13), 1449-1460.
- Betts, J. A., Stevenson, E., Williams, C., Sheppard, C., Grey, E., & Griffin, J. (2005). Recovery of endurance running capacity: effect of carbohydrate-protein mixtures. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 15(6), 590-609.
- Betts, J. A., Williams, C., Boobis, L., & Tsintzas, K. (2008). Increased carbohydrate oxidation after ingesting carbohydrate with added protein. *Medicine and Science in Sports Exercise*, 40(5), 903-912.
- Billat, V. (2002). *Fisiología y metodología del entrenamiento - de la teoría a la práctica* (Primera edición ed.).
- Blomstrand, E. (2006). Role for branched-chain amino acids in reducing central fatigue. *The Journal of Nutrition*, 136(2), 544S-547S.
- Bolea, S., Pertusa, J. A. G., Martín, F., Sanchez-Andrés, J. V., & Soria, B. (1997). Regulation of pancreatic β -cell electrical activity and insulin release by physiological amino acid concentrations. *European Journal of Physiology*, 433(6), 699-704.
- Borgen, N. T. (2017). Running performance, VO₂max, and running economy: The widespread issue of endogenous selection bias. *Sports Medicine*.
- Bourdon, P. (2000). *Physiological Tests for Elite Athletes* (First, Chapter 4 ed.): Human kinetics.
- Brooks, G. A. (2018). The Science and Translation of Lactate Shuttle Theory. *Cell metabolism*, 27(4), 757-785.
- Buckley, J. D., Thomson, R. L., Coates, A. M., Howe, P. R. C., DeNichilo, M. O., & Roney, M. K. (2010). Supplementation with a whey protein hydrolysate enhances recovery of muscle

- force-generating capacity following eccentric exercise. *Journal of Science and Medicine in Sport*, 13(1), 178-181.
- Burdon, C. A., Spronk, I., Cheng, H. L., & O'Connor, H. T. (2017). Effect of glycemic index of a pre-exercise meal on endurance exercise performance: a systematic review and meta-analysis. *Sports Medicine*, 47(6), 1087-1101.
- Burke, L. M., Hawley, J. A., Wong, S. H. S., & Jeukendrup, A. E. (2011). Carbohydrates for training and competition. *Journal of Sports Sciences*, 29(1), 17-27.
- Burke, L. M., Kiens, B., & Ivy, J. L. (2004). Carbohydrates and fat for training and recovery. *Journal of Sports Sciences*, 22(1), 15-30.
- Burke, L. M., Loon, L. J. C. v., & Hawley, J. A. (2017). Post-exercise muscle glycogen resynthesis in humans. *Journal of Applied Physiology*, 122(5), 1055-1067.
- Burnley, M., & Jones, A. M. (2007). Oxygen uptake kinetics as a determinant of sports performance. *European journal of sport science*, 7(2), 63-79.
- Calbet, J. A. L., & MacLean, D. A. (2002). Plasma glucagon and insulin responses depend on the rate of appearance of amino acids after ingestion of different protein solutions in humans. *The Journal of Nutrition*, 132(8), 2174-2182.
- Candow, D. G., Burke, N. C., Smith-Palmer, T., & Burke, D. G. (2006). Effect of whey and soy protein supplementation combined with resistance training in young adults. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 16(3), 233-244.
- Carter, J. M., Jeukendrup, A. E., & Jones, D. A. (2004). The effect of carbohydrate mouth rinse on 1-h cycle time trial performance. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 36(12), 2107-2111.
- Cermak, N. M., & Loon, L. J. C. v. (2013). The Use of Carbohydrates During Exercise as an Ergogenic Aid. *Sports Medicine*, 43, 1139-1155.
- Cermak, N. M., Res, P. T., Groot, L. C. d., Saris, W. H., & Loon, L. J. v. (2012). Protein supplementation augments the adaptive response of skeletal muscle to resistance-type exercise training: a meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 96(6), 1454-1464.
- Chambers, E. S., Bridge, M. W., & Jones, D. A. (2009). Carbohydrate sensing in the human mouth: effects on exercise performance and brain activity. *The Journal of Physiology*, 587(Pt 8), 1779-1794.
- Chrysanthoulos, C., Williams, C., Nowitz, A., Kotsiopoulou, C., & Vleck, V. (2002). The effect of a high carbohydrate meal on endurance running capacity. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 12(2), 157-171.
- Claessens, M., Calame, W., Siemensma, A., Baak, M. v., & Saris, W. (2009). The effect of different protein hydrolysate/carbohydrate mixtures on postprandial glucagon and insulin responses in healthy subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*, 63(1), 48-56.
- Claessens, M., Calame, W., Siemensma, A. D., Saris, W. M., & Baak, M. A. v. (2007). The thermogenic and metabolic effects of protein hydrolysate with or without a carbohydrate load in healthy male subjects. *Metabolism*, 56(8), 1051-1059.
- Cockburn, E., Hayes, P. R., French, D. N., Stevenson, E., & Gibson, A. S. C. (2008). Acute milk-based protein-CHO supplementation attenuates exercise-induced muscle damage. *Applied Physiology Nutrition and Metabolism*, 33(4), 775-783.
- Costill, D. L., Sherman, W. M., Fink, W. J., Maresh, C., Witten, M., & Miller, J. M. (1981). The role of dietary carbohydrates in muscle glycogen resynthesis after strenuous running. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 34(9), 1831-1836.
- Coyle, C. J., Donne, B., & Mahony, N. (2012). Effects of carbohydrate-protein ingestion post-resistance training in male rugby players. *International Journal of Exercise Science*, 5(1), 39-49.
- Coyle, E. F. (2004). Fluid and fuel intake during exercise. *Journal of Sports Sciences*, 22, 39-55.

- Donaldson, C. M., Perry, T. L., & Rose, M. C. (2010). Glycemic Index and Endurance Performance. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 20(2), 154-165.
- Drummond, M. J., Dreyer, H. C., Fry, C. S., Glynn, E. L., & Rasmussen, B. B. (2009). Nutritional and contractile regulation of human skeletal muscle protein synthesis and mTORC1 signaling. *Journal of Applied Physiology*, 106(4), 1374-1384.
- Duffield, R., Dawson, B., & Goodman, C. (2005). Energy system contribution to 1500- and 3000-metre track running. *Journal of Sports Sciences*, 23(10), 993-1002.
- Egan, B. (2016). Protein intake for athletes and active adults: Current concepts and controversies. *Nutrition Bulletin*, 41, 202-213.
- Escobar, K. A., VanDusseldorp, T. A., & Kerksick, C. M. (2017). Carbohydrate intake and resistance-based exercise: are current recommendations reflective of actual need? *British Journal of Nutrition*, 116, 2053-2065.
- Essen, M. V., & Gibala, M. J. (2006). Failure of protein to improve time trial performance when added to a sports drink. *Medicine and Science in Sports Exercise*, 38(8), 1476-1483.
- Evans, E. M., Rowe, D. A., Misic, M. M., Prior, B. M., & Argrimsson, S. A. (2005). Skinfold prediction equation for athletes developed using a four-component model. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 37(11), 2006-2011.
- Faude, O., Kindermann, W., & Meyer, T. (2009). Lactate threshold concepts: how valid are they? *Sports Medicine*, 39(6), 469-490.
- Ferguson-Stegall, L., McCleave, E. L., Ding, Z., Kammer, L. M., Wang, B., Doerner, P. G., Liu, Y., & Ivy, J. L. (2010). The effect of a low carbohydrate beverage with added protein on cycling endurance performance in trained athletes. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 24(10), 2577-2586.
- Fernandes, R. J., Sousa, M., Machado, L., & Vilas-Boas, J. P. (2011). Step Length and Individual Anaerobic Threshold Assessment in Swimming. *International Journal of Sport Medicine*, 32, 940-946.
- Frayn, K. N. (2012). *Regulação metabólica - Uma perspectiva focada no organismo humano* (1ª Edição ed.).
- Gannon, M. C., Nuttall, J. A., Damberg, G., Gupta, V., & Nuttall, F. Q. (1984). Effect of protein ingestion on the glucose and insulin response to a standardized oral glucose load. *Diabetes Care*, 7(5), 465-470.
- Gastin, P. B. (2001). Energy system interaction and relative contribution during maximal exercise. *Sports Medicine*, 31(10), 725-741.
- Gladden, L. B. (2004). Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. *The Journal of physiology*, 558(Pt 1), 5-30.
- Gonzalez, J. T., Fuchs, C. J., Betts, J. A., & Loon, L. J. C. v. (2017). Glucose Plus Fructose Ingestion for Post-Exercise Recovery—Greater than the Sum of Its Parts? *Nutrients*, 9(4), E344.
- Hall, A. H., Leveritt, M. D., Ahuja, K. D. K., & Shing, C. M. (2013). Coingestion of carbohydrate and protein during training reduces training stress and enhances subsequent exercise performance. *Applied Physiology Nutrition and Metabolism*, 38(6), 597-604.
- Hall, G. v., Saris, W. H. M., Schoor, P. A. I. v. d., & Wagenmakers, A. J. M. (2000). The effect of free glutamine and peptide ingestion on the rate of muscle glycogen resynthesis in man. *International Journal of Sports Medicine*, 21(1), 25-30.
- Hargreaves, M., & Spriet, L. L. (2017). Exercise Metabolism: Fuels for the Fire. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*.
- Hawley, J. A., Lundby, C., Cotter, J. D., & Burke, L. M. (2018). Maximizing Cellular Adaptation to Endurance Exercise in Skeletal Muscle. *Cell metabolism*, 27(5), 962-976.
- Hayashi, Y., & Seino, Y. (2018). Regulation of amino acid metabolism and α -cell proliferation by glucagon. *Journal of Diabetes Investigation*.

- Hermans, M. P., Schmeer, W., & Henquin, J. C. (1987). The permissive effect of glucose, tolbutamide and high K⁺ on arginine stimulation of insulin release in isolated mouse islets. *Diabetologia*, 30(8), 659-665.
- Howley, E. T., Bassett, D. R., & Welch, H. G. (1995). Criteria for maximal oxygen uptake: review and commentary. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 27(9), 1292-1301.
- Hulmi, J. J., Lockwood, C. M., & Stout, J. R. (2010). Effect of protein/essential amino acids and resistance training on skeletal muscle hypertrophy: A case for whey protein. *Nutrition & Metabolism*, 7:51.
- Ivy, J. L., Goforth, H. W., JR., Damon, B. M., McCauley, T. R., Parsons, E. C., & Price, T. B. (2002). Early postexercise muscle glycogen recovery is enhanced with a carbohydrate-protein supplement. *Journal of Applied Physiology*, 93(4), 1337-1344.
- Ivy, J. L., Katz, A. L., Cutler, C. L., Sherman, W. M., & Coyle, E. F. (1988). Muscle glycogen synthesis after exercise: effect of time of carbohydrate ingestion. *Journal of Applied Physiology*, 64(4), 1480-1485.
- Ivy, J. L., Lee, M. C., Jr, J. T. B., & Reed, M. J. (1988). Muscle glycogen storage after different amounts of carbohydrate ingestion. *Journal of Applied Physiology*, 65(5), 2018-2023.
- Ivy, J. L., Res, P. T., Sprague, R. C., & Widzer, M. O. (2003). Effect of a carbohydrate-protein supplement on endurance performance during exercise of varying intensity. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 13(3), 382-395.
- Jäger, R., Kerksick, C. M., Campbell, B. I., Cribb, P. J., Wells, S. D., Skwiat, T. M., Purpura, M., Ziegenfuss, T. N., Ferrando, A. A., Arent, S. M., Smith-Ryan, A. E., Stout, J. R., Arciero, P. J., Ormsbee, M. J., Taylor, L. W., Wilborn, C. D., Kalman, D. S., Kreider, R. B., Willoughby, D. S., Hoffman, J. R., Krzykowski, J. L., & Antonio, J. (2017). International Society of Sports Nutrition Position Stand: protein and exercise. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 14-20.
- Jentjens, R., & Jeukendrup, A. E. (2003). Determinants of post-exercise glycogen synthesis during short-term recovery. *Sports Medicine*, 33(2), 117-144.
- Jentjens, R. L. P. G., Moseley, L., Waring, R. H., Harding, L. K., & Jeukendrup, A. E. (2004). Oxidation of combined ingestion of glucose and fructose during exercise. *Journal of applied physiology*, 96(4), 1277-1284.
- Jeukendrup, A. E. (2008). Carbohydrate feeding during exercise. *European Journal of Sport Science*, 8(2), 77-86.
- Jeukendrup, A. E. (2011). Nutrition for endurance sports: Marathon, triathlon, and road cycling. *Journal of sports sciences*, 29(1), S91-99.
- Jeukendrup, A. E., & Chambers, E. S. (2010). Oral carbohydrate sensing and exercise performance. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 13(4), 447-451.
- Jiang, G., & Zhang, B. B. (2003). Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 284(4), 671-678.
- Joyner, M. J., & Coyle, E. F. (2008). Endurance exercise performance: the physiology of champions. *Journal of Physiology*, 586(1), 35-44.
- Kerksick, C. M., Arent, S., Schoenfeld, B. J., Stout, J. R., Campbell, B., Wilborn, C. D., Taylor, L., Kalman, D., Smith-Ryan, A. E., Kreider, R. B., Willoughby, D., Arciero, P. J., VanDusseldorp, T. A., Ormsbee, M. J., Wildman, R., Greenwood, M., Ziegenfuss, T. N., Aragon, A. A., & Antonio, a. J. (2017). International society of sports nutrition position stand: nutrient timing. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*(14:33).
- Kerksick, C. M., & Leutholtz, B. (2005). Nutrient Administration and Resistance Training. *International Society of Sports Nutrition*, 2(1), 50-67.
- Kirwan, J. P., Cyr-Campbell, D., Campbell, W. W., Scheiber, J., & Evans, W. J. (2001). Effects of moderate and high glycemic index meals on metabolism and exercise performance. *Metabolism* 50(7).

- Koopman, R., Pannemans, D. L. E., Asker E. Jeukendrup, A. P. G., Senden, J. M. G., Halliday, D., Saris, W. H. M., Loon, L. J. C. v., & Wagenmakers, A. J. M. (2004). Combined ingestion of protein and carbohydrate improves protein balance during ultra-endurance exercise. *American journal of of physiology, endocrinology and metabolism*, 287(4), E712–E720.
- Krieger, J. W., Sitren, H. S., Daniels, M. J., & Langkamp-Henken, B. (2006). Effects of variation in protein and carbohydrate intake on body mass and composition during energy restriction: a meta-regression. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 83(2), 260-274.
- Layman, D. K., Evans, E., Baum, J. I., Seyler, J., Erickson, D. J., & Boileau, R. A. (2005). Dietary protein and exercise have additive effects on body composition during weight loss in adult women. *The Journal of Nutrition*, 135(8), 1903-1910.
- Lee, R. C., Wang, Z., Heo, M., Ross, R., Janssen, I., & Heymsfield, S. B. (2000). Total-body skeletal muscle mass: development and cross-validation of anthropometric prediction models. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72(3), 796-803.
- Loon, L. J. C. v., Kruijshoop, M., Menheere, P. P. C. A., Wagenmakers, A. J. M., Saris, W. H. M., & Keizer, H. A. (2003). Amino acid ingestion strongly enhances insulin secretion in patients with long-term type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 26(3), 625-630.
- Loon, L. J. v., Saris, W. H., Kruijshoop, M., & Wagenmakers, A. J. (2000). Maximizing postexercise muscle glycogen synthesis: carbohydrate supplementation and the application of amino acid or protein hydrolysate mixtures. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72(1), 106-111.
- Loon, L. J. v., Saris, W. H., Verhagen, H., & Wagenmakers, A. J. (2000). Plasma insulin responses after ingestion of different amino acid or protein mixtures with carbohydrate. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 72(1), 96-105.
- M. Kabadi, U. (1991). Dose-kinetics of pancreatic alpha- and beta-cell responses to a protein meal in normal subjects. *Metabolism*, 40(3), 236-240.
- Manders, R. J., Wagenmakers, A. J., Koopman, R., Zorenc, A. H., Menheere, P. P., Schaper, N. C., Saris, W. H., & Loon, L. J. v. (2005). Co-ingestion of a protein hydrolysate and amino acid mixture with carbohydrate improves plasma glucose disposal in patients with type 2 diabetes. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 82(1), 76-83.
- Marquet, L.-A., Hausswirth, C., Molle, O., Hawley, J. A., Burke, L. M., Tiollier, E., & Brisswalter, J. (2016). Periodization of carbohydrate intake: short-term effect on performance. *Nutrients*, 8(12), 755.
- McCleave, E. L., Ferguson-Stegall, L., Ding, Z., III, P. G. D., Wang, B., Kammer, L. M., & Ivy, J. L. (2011). A low carbohydrate-protein supplement improves endurance performance in female athletes. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 25(4), 879-888.
- McLellan, T. M., Pasiakos, S. M., & Lieberman, H. R. (2014). Effects of protein in combination with carbohydrate supplements on acute or repeat endurance exercise performance: a systematic review. *Sports Medicine*, 44(4), 535-550.
- Medicine, A. C. o. S., Sawka, M. N., Burke, L. M., Eichner, E. R., Maughan, R. J., Montain, S. J., & Stachenfeld, N. S. (2007). Exercise and Fluid Replacement. *Medicine and science in sports and exercise*, 39(2), 377-390.
- Mignone, L. E., Wu, T., Horowitz, M., & Rayner, C. K. (2015). Whey protein: The “whey” forward for treatment of type 2 diabetes? *World Journal of Diabetes*, 6(14), 1274-1284.
- Mitchell, C. J., McGregor, R. A., D’Souza, R. F., Thorstensen, E. B., Markworth, J. F., Fanning, A. C., Poppitt, S. D., & Cameron-Smith, D. (2015). Consumption of milk protein or whey protein results in a similar increase in muscle protein synthesis in middle aged men. *Nutrient*, 7, 8685-8699.
- Morifuji, M., Ishijaka, M., Baba, S., Fukuda, K., Matsumoto, H., Koga, J., kanegae, M., & Higuchi, M. (2010). Comparison of Different Sources and Degrees of Hydrolysis of Dietary

- Protein: Effect on Plasma Amino Acids, Dipeptides, and Insulin Responses in Human Subjects. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(15), 8788-8797.
- Niles, E. S., Lachowetz, T., Garfi, J., Sullivan, W., Smith, J. C., Leyh, B. P., & Headley, S. A. (2001). Carbohydrate-protein drink improves time to exhaustion after recovery from endurance exercise. *Exercise Nutrition*, 4(1), 45-52.
- Nimmo, M. A., & Ekblom, B. (2005). Fatigue and illness in athletes. *Journal of Sports Sciences*, 25(S1), S93 – S102.
- O'Brien, W. J., Stannard, S. R., Clarke, J. A., & Rowlands, D. S. (2013). Fructose–Maltodextrin Ratio Governs Exogenous and Other CHO Oxidation and Performance. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 45(9), 1814-1824.
- Oliveira, E. P. d., & Burini, R. C. (2014). Carbohydrate-dependent, exercise-induced gastrointestinal distress. *Nutrients*, 6(10), 4191-4199.
- Oliveira, E. P. d., Burini, R. C., & Jeukendrup, A. (2014). Gastrointestinal complaints during exercise: prevalence, etiology, and nutritional recommendations. *Sports Medicine*, 44(1), S79-85.
- Ormsbee, M. J., Bach, C. W., & Baur, D. A. (2014). Pre-Exercise Nutrition: The role of macronutrients, modified starches and supplements on metabolism and endurance performance. *Nutrients*, 6(5), 1782-1808.
- Pasiakos, S. M., Lieberman, H. R., & McLellan, T. M. (2014). Effects of protein supplements on muscle damage, soreness and recovery of muscle function and physical performance: a systematic review. *Sports Medicine*, 44(5), 655-670.
- Pasiakos, S. M., & McClung, J. P. (2011). Supplemental dietary leucine and the skeletal muscle anabolic response to essential amino acids. *Nutrition Review*, 69, 550-557.
- Pedersen, D. J., Lessard, S. J., Coffey, V. G., Churchley, E. G., Wootton, A. M., Ng, T., Watt, M. J., & Hawley, J. A. (2008). High rates of muscle glycogen resynthesis after exhaustive exercise when carbohydrate is coingested with caffeine. *Journal of Applied Physiology*, 105(1), 7-13.
- Powers, S. K., & Howley, E. T. (2004). *Fisiologia do Exercício - Teoria e Aplicação ao Condicionamento e ao Desempenho* (Quinta Edição ed.).
- Qin, L., Wong, S. H., Sun, F. H., Huang, Y., Sheridan, S., & Sit, C. H. P. (2017). The effect of carbohydrate and protein co-ingestion on energy substrate metabolism, sense of effort, and affective responses during prolonged strenuous endurance exercise. *Physiology & Behavior*, 174, 170-177.
- Rabinowitz, D., Merimee, T. J., Maffezzoli, R., & Burgess, J. A. (1966). Patterns of hormonal release after glucose, protein, and glucose plus protein. *Lancet*, 2(7461), 454-456.
- Ranchordas, M. K., Dawson, J. T., & Russell, M. (2017). Practical nutritional recovery strategies for elite soccer players when limited time separates repeated matches. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 12, 14-35.
- Roberts, S., Desbrow, B., Grant, G., Anoopkumar-Dukie, S., & Leveritt, M. (2013). Glycemic response to carbohydrate and the effects of exercise and protein. *Nutrition*, 29(6), 881-885.
- Santos, P. J. M., & Santos, J. A. R. (2002). *Investigação aplicada em atletismo - Um contributo da FCDEF.UP para o Desenvolvimento do meio-fundo e fundo: Multitema*.
- Saunders, M. J., Kane, M. D., & Todd, M. K. (2004). Effects of a carbohydrate-protein beverage on cycling endurance and muscle damage. *Medicine and Science in Sports Exercise*, 36(7), 1233-1238.
- Saunders, M. J., Luden, N. D., & Herrick, J. E. (2007). Consumption of an oral carbohydrate-protein gel improves cycling endurance and prevents postexercise muscle damage. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 21(3), 678–684.

- Saunders, M. J., Moore, R. W., Kies, A. K., Luden, N. D., & Pratt, C. A. (2009). Carbohydrate and protein hydrolysate coingestions improvement of late-exercise time-trial performance. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 19(2), 136-149.
- Schaun, G. Z. (2017). The maximal oxygen uptake verification phase: a light at the end of the tunnel? *Sports Medicine*, 3(1), 44.
- Schoenfeld, B. J., Aragon, A. A., & Krieger, J. W. (2013). The effect of protein timing on muscle strength and hypertrophy: a meta-analysis. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 10(1), 53.
- Shirreffs, S. M., & Sawka, M. N. (2011). Fluid and electrolyte needs for training, competition, and recovery. *Journal of Sports Sciences*, 29(S1), S39-S46.
- Silva, T. d. A. e., Souza, M. E. D. C. A. d., Amorim, J. F. d., Stathis, C. G., Leandro, C. G., & Lima-Silva, A. E. (2014). Can Carbohydrate Mouth Rinse Improve Performance during Exercise? A Systematic Review. *Nutrients*, 6(1), 1-10.
- Smith, P. A., Sakura, H., Coles, B., Gummerson, N., Proks, P., & Ashcroft, F. M. (1997). Electrogenic arginine transport mediates stimulus-secretion coupling in mouse pancreatic B-cells. *The Journal of Physiology*, 499(3), 625-635.
- Sousa, A., Figueiredo, P., Zamparo, P., Pyne, D. B., Vilas-Boas, J. P., & Fernandes, R. J. (2015). Exercise Modality Effect on Bioenergetical Performance at V'O₂max Intensity. *Medicine and science in sports and exercise*, 47(8), 1705-1713.
- Sousa, M., Teixeira, V. H., & Soares, J. (2014). Dietary strategies to recover from exercise-induced muscle damage. *International Journal of food sciences and nutrition*, 65(2), 151-163.
- STAPLES, A. W., BURD, N. A., WEST, D. W. D., CURRIE, K. D., ATHERTON, P. J., MOORE, D. R., RENNIE, M. J., MACDONALD, M. J., BAKER, S. K., & PHILLIPS, S. M. (2011). Carbohydrate does not augment exercise-induced protein accretion versus protein alone. *Medicine and science in sports and exercise*, 43(7), 1154-1161.
- Stijn Soenen, E. A. P. M., Ananda Hochstenbach-Waelen, Sofie G. T. Lemmens and Margriet S. Westerterp-Plantenga. (2013). Normal protein intake is required for body weight loss and weight maintenance, and elevated protein intake for additional preservation of resting energy expenditure and fat free mass. *The Journal of Nutrition*, 143(5), 591-596.
- Tipton, K. D., Ferrando, A. A., Phillips, S. M., Jr., D. D., & Wolfe, R. R. (1999). Postexercise net protein synthesis in human muscle from orally administered amino acids. *American Physiological Society*, 276(4 Pt 1), E628-634.
- Tokmakidis, S. P., & Karamanolis, I. A. (2008). Effects of carbohydrate ingestion 15 min before exercise on endurance running capacity. *Applied Physiology Nutrition and Metabolism*, 33(3), 441-449.
- Toone, R. J., & Betts, J. A. (2010). Isocaloric carbohydrate versus carbohydrate-protein ingestion and cycling time-trial performance. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 20(1), 34-43.
- Travis, T. D., Anne, E. K., & M., B. L. (2016). Position of the academy of nutrition and dietetics, dietitians of canada, and the american college of sports medicine: nutrition and athletic performance. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 116(3), 501-528.
- Trommelen, J., & Loon, L. J. C. v. (2016). Pre-Sleep Protein Ingestion to Improve the Skeletal Muscle Adaptive Response to Exercise Training. *Nutrients*, 8(12), E763.
- Tsintzas, K., & Williams, C. (1998). Human muscle glycogen metabolism during exercise. Effect of carbohydrate supplementation. *Sports medicine*, 25(1), 7-23.
- Weijs, P. J. M., & Wolfe, R. R. (2016). Exploration of the protein requirement during weight loss in obese older adults. *Clinical Nutrition*, 35(2), 394-398.
- Williams, M. B., Raven, P. B., Fogt, D. L., & Ivy, J. L. (2003). Effects of recovery beverages on glycogen restoration and endurance exercise performance. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 17(1), 12-19.

- Willoughby, D. S., Stout, J. R., & Wilborn, C. D. (2007). Effects of resistance training and protein plus amino acid supplementation on muscle anabolism, mass, and strength. *Amino Acids*, 32(4), 467-477.
- Witard, O. C., Jackman, S. R., Breen, L., Smith, K., Selby, A., & Tipton, K. D. (2014). Myofibrillar muscle protein synthesis rates subsequent to a meal in response to increasing doses of whey protein at rest and after resistance exercise. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 99(1), 86-95.
- Wong, S. H.-S., Sun, F.-H., Chen, Y.-J., Li, C., Zhang, Y.-J., & Huang, W. Y.-J. (2017). Effect of pre-exercise carbohydrate diets with high vs low glycemic index on exercise performance: a meta-analysis. *Nutrition reviews*, 75(5), 327-338.
- Wycherley, T. P., Moran, L. J., Clifton, P. M., Noakes, M., & Brinkworth, G. D. (2012). Effects of energy-restricted high-protein, low-fat compared with standard-protein, low-fat diets: a meta-analysis of randomized controlled trials. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 96(6), 1281-1298.
- Zeevi, D., Korem, T., Zmora, N., Israeli, D., Rothschild, D., Weinberger, A., Ben-Yacov, O., Lador, D., Avnit-Sagi, T., Lotan-Pompan, M., Suez, J., Mahdi, J. A., Matot, E., Malka, G., Kosower, N., Rein, M., Zilberman-Schapira, G., Dohnalova, L., Pevsner-Fischer, M., Bikovsky, R., Halpern, Z., Elinav, E., & Segal, E. (2015). Personalized Nutrition by Prediction of Glycemic Responses. *Cell*, 163(5), 1079-7094.